

**Identifikation neuer Komponenten der dritten
Plastidenmembran
und
Subkompartimentierung des endoplasmatischen
Retikulums in *Phaeodactylum tricornutum***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

M.Sc.

Jonny Gentil

aus Aschaffenburg

Marburg/Lahn 2017

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180)
als Dissertation angenommen am: 13.12.2017

Erstgutachter: Prof. Dr. Uwe-G. Maier
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Prof. Dr. Ralf Jakob
Prof. Dr. Susanne Önel

Tag der Disputation am: 21.12.2017

" Your focus determines your reality."

(Qui-Gon Jin)

Publikationen

Übersichtsartikel:

Gentil, J.; Hempel, F.; Moog, D.; Zauner, S.; Maier, U.-G. (2017): Review: origin of complex algae by secondary endosymbiosis: a journey through time. In: *Protoplasma*, doi: 10.1007/s00709-017-1098-8

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	4
Inhaltsverzeichnis.....	5
Zusammenfassung.....	8
Summary	9
Abkürzungsverzeichnis.....	10
1. Einleitung.....	11
1.1 Evolution komplexer Plastiden.....	11
1.2 Proteintransport in komplexe Plastiden rhodophytischen Ursprungs	15
1.2.1 Transport in das periplastidäre Kompartiment (PPC)	15
1.2.2 Transport in primäre Plastiden	17
1.2.3 Transport von Proteinen in die äußere Membran von primären Plastiden	19
1.3 Assemblierung von β -barrel Proteinen in Bakterien und Organellen.....	20
1.3.1 Der BAM-Komplex Gram-negativer Bakterien.....	20
1.3.2 Assemblierung von β -barrel Proteinen in Mitochondrien und Plastiden	24
1.4 Das endoplasmatische Retikulum und die <i>Unfolded Protein Response</i>	25
1.4.1 Strukturen und Subdomänen des endoplasmatischen Retikulums.....	25
1.4.2 Die <i>Unfolded Protein Response</i>	28
1.4.2.1 <i>Activating transcription factor 6</i>	28
1.4.2.2 <i>Inositol-Requiring Kinase 1</i>	29
1.4.2.3 <i>PKR-like ER Kinase (PERK)</i>	32
1.4.3 Evolution der UPR in Protisten.....	34
2. Zielsetzung.....	35
3. Ergebnisse	36
3.1 Vorhersage und Lokalisation von Proteinen der äußeren Chloroplastenmembran	36
3.1.1 <i>In silico</i> Vorhersage von potentiellen plastidären β -barrel Proteinen aus dem Proteom von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	37
3.1.2 <i>In vivo</i> Lokalisation putativer plastidärer β -barrel Proteine	42
3.1.2.1 <i>In vivo</i> Lokalisationen in der Plasmamembran.....	42
3.1.2.2 <i>In vivo</i> Lokalisationen im Cytosol	44
3.1.2.3 <i>In vivo</i> Lokalisationen in diversen Kompartimenten	45
3.1.2.4 <i>In vivo</i> Lokalisationen im endoplasmatischen Retikulum	48
3.1.2.5 Lokalisationen in der Plastide.....	50

3.2 Untersuchung der Subkompartimentierung des endoplasmatischen Retikulums in <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	53
3.2.1 Identifizierung von Faktoren der UPR in Organismen mit komplexen Plastiden	53
3.2.2 Markierung von Subkompartimenten des endoplasmatischen Retikulums in <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	55
3.2.3 Lokalisation von IRE1 und PERK im <i>hostER</i>	58
3.2.4 Kolokalisation von PERK mit hDer1-2	60
4. Diskussion.....	61
4.1 Untersuchung des Proteoms der Diatomee <i>Phaeodactylum tricornutum</i> auf plastidäre β -barrel Proteine	61
4.2 Subkompartimentierung des endoplasmatischen Retikulums	65
4.2.1 Die UPR ist hauptsächlich auf das hER beschränkt	65
4.2.2 Evolution der UPR	69
5. Material und Methoden.....	73
5.1 Material.....	73
5.1.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen	73
5.1.2 Enzyme	73
5.1.3 Molekularbiologische Kits	73
5.1.4 Geräte	74
5.1.5 Organismen	75
5.1.6 Vektoren.....	75
5.1.7 Antikörper	76
5.1.8 DNA- und Proteinmolekulargewichtsstandards.....	76
5.1.9 Oligonukleotide	77
5.1.10 Software- und Internetanwendungen	81
5.2 Methoden.....	83
5.2.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> TOP10	83
5.2.2 Kultivierung von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX 646.....	83
5.2.3 Analyse und Modifikation von Nukleinsäuren.....	84
5.2.3.1 Isolation von Gesamt-DNA und –RNA aus <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	84
5.2.3.2 DNaseI-Behandlung und reverse Transkription (RT-PCR)	85
5.2.3.3 Amplifikation von Nukleinsäuren – Polymerasekettenreaktion (PCR).....	85
5.2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese und Elution	86
5.2.3.5 Restriktion von Nukleinsäuren	86
5.2.3.6 Ligation und Gibson Assembly	87

5.2.3.7 Transformation von RbCl ₂ -kompetenten <i>Escherichia coli</i> TOP10-Zellen	88
5.2.3.8 Plasmidisolierung aus <i>Escherichia coli</i> mittels alkalischer Lyse.....	89
5.2.3.9 DNA Sequenzierung.....	89
5.2.3.10 Biolistische Transfektion von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	90
5.2.4 Proteinanalytik.....	91
5.2.4.1 Zellfraktionierung, Carbonatextraktion und TCA-Fällung	91
5.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz.....	92
5.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	93
5.2.4.4 Western Blot und Immunodetektion	93
5.2.5 <i>In vivo</i> Lokalisationsstudien	95
5.2.5.1 Lokalisationsstudien von eGFP- und mRFP-Fusionsproteinen.....	95
5.2.5.2 4', 6-Diamidino-2-Phenylindol-Färbung von Nukleinsäuren	95
5.2.5.3 MitoTracker Orange CMTMRos-Färbung von Mitochondrien	95
5.2.5.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (KLSM) und Epifluoreszenzmikroskopie	95
5.2.6 <i>In silico</i> Vorhersagen von plastidären β -barrel Proteinen	96
6. LiteraturverzeichnisLiteraturverzeichnis.....	97
7. Anhang	117
7.1 Analyse von wahrscheinlich plastidären Proteinen	117
7.2 Vorhersage N-terminaler Zielsteuerungssequenzen	121
7.3 Vorhersage durch TMBETA-net und BOCTOPUS1.....	123
Danksagung.....	124

Zusammenfassung

Durch einen Prozess, der als sekundäre Endosymbiose bezeichnet wird, wurde eine Rotalge als Endosymbiont aufgenommen. Dies führte zur Entstehung der komplexen Plastiden von Cryptophyten, Haptophyten, Heterokontophyten und Apicomplexa. Das Genom dieser ehemaligen Rotalge wurde im Laufe der Evolution dramatisch reduziert und zum größten Teil in den Wirtskern transferiert. Dies führte dazu, dass die meisten plastidären Proteine nun im Zellkern des Wirtes kodiert sind und aus dem Cytosol in die Plastide importiert werden müssen. Es mussten entsprechende Translokationsmechanismen entwickelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht neue Komponenten der dritten Plastidenmembran zu identifizieren, welche auf die äußere Chloroplastenmembran primärer Plastiden zurückgeht. Diese Membran unterscheidet sich von anderen plastidären Membranen durch die Präsenz von β -barrel Proteinen, die für die äußeren Membranen von Gram-negativen Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten charakteristisch sind. Mit Hilfe verschiedener Algorithmen wurden putative plastidäre β -barrel Proteine vorhergesagt und als Fusionsproteine in *P. tricornutum* lokalisiert. Es wurden von 23 Proteinen, vier in der Plasmamembran, vier im Cytosol, fünf im ER, fünf außerhalb der Plastide und fünf in der Plastide lokalisiert. Es konnte kein Protein in der dritten Plastidenmembran identifiziert werden. Die Vorhersagealgorithmen sind nicht dafür geeignet eukaryote Proteome auf β -barrel Proteine hin zu analysieren. Des Weiteren lag ein anderes Problem in der Beschaffenheit der Genmodelle, welche die Basis der Vorhersage bildeten.

In einem zweiten Projekt wurde die Subkompartimentierung des ERs in *P. tricornutum* untersucht. Basierend auf der Erkenntnis, dass das ER in ein *hostER*, die Kernhülle (NE) und das cER eingeteilt werden kann, wurde untersucht, ob sich hER und cER in ihrer Funktion unterscheiden. Basierend auf der Annahme, dass hER und cER durch den Tag-Nacht-Zyklus der Photosynthese unterschiedlichen physiologischen Bedingungen ausgesetzt sind, wurde gefolgert, dass einige Funktionen wie zum Beispiel die Proteinqualitätskontrolle und -faltung auf das hER beschränkt sein könnten. Daher wurden Faktoren der UPR in *P. tricornutum* untersucht. Überraschenderweise konnten IRE1 und PERK in Heterokontophyten und Haptophyten identifiziert werden. Lokalisationsstudien der UPR-Faktoren zeigten, dass diese hauptsächlich auf das hER und den NE beschränkt sind, wohingegen hDer1-2 als Beispiel für Proteindegradation im gesamten ER und Transporterproteine wie Tpt1 hauptsächlich im cER vorhanden sind. Die Abwesenheit der UPR im cER lässt sich durch die Physiologie begründen. Außerdem wirft die Präsenz von PERK und IRE1 in Protisten ein neues Licht auf die Sichtweise der Evolution der UPR. So ist eine alternative Entstehungsgeschichte der UPR denkbar.

Summary

In a process termed secondary endosymbiosis a red alga was established as an endosymbiont. This led to the evolution of the complex plastids found in cryptophytes, haptophytes, heterokontophytes and apicomplexans. The genome of this former red alga was drastically reduced and mostly transferred into the host nucleus. Thus, most plastidal proteins are now encoded in the host nucleus and have to be imported from the cytosol into the plastid. Appropriate transport mechanisms had to be evolved. The aim of this work was the identification of new components of the third plastid membrane. It evolved from the outer chloroplast envelope of primary plastids. This membrane is distinct from other plastidal membranes due to the fact that it presumably contains β -barrel proteins which are characteristic of outer membranes of gram-negative bacteria, mitochondria and chloroplasts. With different algorithms putative plastidal β -barrel proteins were predicted and localized as fusion proteins in *P. tricornutum*. Out of 23 proteins, four were localized to the plasma membrane. Four other proteins were localized to the cytosol. Five proteins were localized to the ER. Additionally five proteins were localized to various compartments outside the plastid and five proteins were localized to the plastid. There were no new proteins of the third plastidal membrane identified. The used prediction algorithms are not suited to analyze a eukaryotic genome for β -barrel proteins. Moreover, the quality of the predicted gene models of the database complicated the analysis.

In the second part of this work the subcompartmentalization of the ER of *P. tricornutum* was analyzed. Based on the classification of the ER into a hostER, nuclear envelope and cER the functions of these two subcompartments were tested. Based on the assumption that hER and cER are exposed to different physiological conditions during night and day, functions as protein quality control and protein folding might be restricted to the hER. Therefore, factors of the UPR were studied. Surprisingly, IRE1 and PERK were identified in heterokontophytes and haptophytes. Localization studies of these UPR factors showed that these are indeed mainly found in the hER and only in minor concentrations in the nuclear envelope and cER. hDer1-2 which takes part in protein degradation shows an equal distribution over the complete ER, while transporter proteins like Tpt1 are mainly found in the cER and nuclear envelope. The absence of the UPR factors in the cER can be explained by different physiological conditions during night and day inside of these two subcompartments. Additionally, the presence of PERK and IRE1 in protists sheds a new light on the evolution of the UPR. An alternative evolutionary history is conceivable.

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	<i>volume per volume</i>	mRFP	<i>monomeric red fluorescent protein</i>
(w/v)	<i>weight per volume</i>	NE	<i>nuclear envelope</i>
° C	Grad Celsius	NPC	<i>nuclear pore complex</i>
BAM	<i>β-barrel assembly machinery</i>	OEP	<i>outer envelope protein</i> (meist α-helical)
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>	OM	<i>outer membrane</i>
BTS	<i>bipartite targeting sequence</i>	OMP	<i>outer membrane protein (β-barrel)</i>
cDNA	komplementäre DNA	PAF	Plastidenautofluoreszenz
cER	<i>chloroplast ER</i>	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
COPII	<i>coat protein II complex</i>	pER	peroxisomales ER
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	PPC	Periplastidäres Kompartiment
DIC	<i>differential interference contrast</i>	PPM	Periplastidäre Membran
DNA	Desoxyribonukleinsäure	rER	raues ER
<i>eGFP</i>	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	RIDD	<i>regulated IRE1-dependent decay</i>
EGT	endosymbiontischer Gentransfer	RNA	Ribonukleinsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum	RT	Raumtemperatur
ERAC	<i>ER-associated compartment</i>	SAM	<i>sorting and assembly machinery</i>
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>	SELMA	<i>symbiont specific ERAD-like machinery</i>
ERMES	<i>endoplasmic reticulum mitochondria encounter structure</i>	sER	Glattes ER
EST	<i>expressed sequence tag</i>	SP	Signalpeptid
g	Erdbeschleunigung	TM	Transmembrandomäne
GDP	Guanosindiphosphat	TOC/TIC	<i>translocon of the outer/inner chloroplast membrane</i>
GTP	Guanosintriphosphat	TOM/TIM	<i>Translocon of the outer/inner mitochondrial envelope</i>
hER	<i>hostER</i>	TP	Transitpeptid
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>	TPL	<i>transit peptide like sequence</i>
IMS	Intermembranraum	U	Unit
kDa	Kilodalton	UPR	<i>unfolded protein response</i>

1. Einleitung

1.1 Evolution komplexer Plastiden

Vorläufer der heutigen Cyanobakterien erwarben vor etwa 3,5 Milliarden Jahren die Fähigkeit der oxygenen Photosynthese (Stoebe und Maier 2002). Allerdings ist der Zeitpunkt der Entstehung der oxygenen Photosynthese immer noch strittig und verschiedene Szenarien wurden erwogen. Neuere Studien postulieren einen Ursprung vor 2,4 bis 2,7 Milliarden Jahren mit dem Hinweis darauf, dass es zwar Fossilien von Mikroorganismen gibt, diese aber nicht zwangsläufig auch die oxygene Photosynthese nachweisen (Lyons et al. 2014; Schopf 2011; Soo et al. 2017). Der genaue Zeitpunkt der Entstehung bleibt jedoch unklar. Zunächst war diese Fähigkeit auf Prokaryoten beschränkt. In der modernen Endosymbiontentheorie wird postuliert, wie ein heterotropher Eukaryot durch Phagozytose ein ancestrales Cyanobakterium aufnahm, jedoch nicht verstoffwechselte (Archibald 2015; Margulis 1970; Martin und Herrmann 1998; Martin et al. 2002). Das Bakterium wurde stattdessen schrittweise als Organell etabliert. Während der gemeinsamen Entwicklung von Wirt und Endosymbiont wurden Teile des Symbionten-Genoms durch den sogenannten endosymbiontischen Gentransfer (EGT) in den Wirtsnukleus integriert sowie nicht mehr benötigte Gene deletiert (Burki et al. 2012a; Martin und Herrmann 1998; Sheiner und Striepen 2013). Durch diesen Prozess sind die primären Plastiden der Archaeplastida, bestehend aus den Chlorophyta, Glaucophyta und Rhodophyta, mit zwei umhüllenden Membranen entstanden (Adl et al. 2005; Cavalier-Smith 2003). Die Plastiden dieser drei Gruppen gehen auf ein gemeinsames endosymbiontisches Ereignis zurück und werden als monophyletisch angesehen (Cavalier-Smith 2003; Marin et al. 2005; Yoon et al. 2004) (s. Abb. 1). Die molekularen Daten deuten darauf hin, dass dies vor ungefähr 1,5 Milliarden Jahren geschehen ist (Archibald 2015; Yoon et al. 2004). Bis vor Kurzem ging man von einer einzigen primären Endosymbiose aus, jedoch wurde in der Amöbe *Paulinella chromatophora* ein Chromatophor nachgewiesen, welcher den primären Plastiden ähnlich ist, jedoch aus einem unabhängigen und nicht so lange zurückliegenden Ereignis hervorging (Marin et al. 2005; Nowack et al. 2011; Nowack und Grossman 2012; Nowack et al. 2016). Auch hier wurde sowohl EGT als auch Proteinimport nachgewiesen (Nowack und Grossman 2012; Nowack et al. 2016).

Allerdings gibt es viele photosynthetische Organismen, welche eine Plastide mit drei oder vier Hüllmembranen besitzen (Cavalier-Smith 2000). Diese sogenannten komplexen Plastiden sind nicht durch primäre Endosymbiose zu erklären. Plastiden mit vier umhüllenden Membranen können in Cryptophyten, Haptophyten, Chlorarachniophyten, Stramenopilen und Apicomplexa beobachtet werden, wohingegen in Dinoflagellaten und Euglenophyten nur Plastiden mit drei Membranen enthalten sind (Cavalier-Smith 1999, 2000) (s. Abb. 1). In einer Eukaryot-Eukaryot

Symbiose wurde ein bereits aus der primären Endosymbiose hervorgegangener, phototropher Eukaryot durch einen anderen Eukaryoten aufgenommen (Cavalier-Smith 1999). Dieser Prozess wird als sekundäre Endosymbiose bezeichnet. Ähnlich wie bei der primären Endosymbiose kam es auch hier zu einer Reduktion des Symbionten. Tatsächlich konnten mit den Cryptophyta und den Chlorarachniophyta Organismen gefunden werden, welche den reduzierten Zellkern (Nukleomorph) des Endosymbionten noch erhalten haben und damit diese Hypothese stützen (Curtis et al. 2012). Die sekundäre Endosymbiose fand mindestens dreimal unabhängig voneinander statt. So wurden sowohl Angehörige der Chlorophyta als auch der Rhodophyta von anderen Wirtsorganismen aufgenommen. Im Falle der grünen Linie wurde bereits nachgewiesen, dass Chlorarachniophyten und Euglenophyten separat voneinander entstanden und ihre Plastiden polyphyletischen Ursprungs sind (Rogers et al. 2007).

Die Aufnahme einer Rotalge führte zur Entstehung der Cryptophyten, Haptophyten, Stramenopilen, Apicomplexa und der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten, welche zunächst als Chromalveolaten gruppiert wurden (Cavalier-Smith 1999; Elias und Archibald 2009). In der Chromalveolatheorie ging man noch von einem monophyletischen Ursprung der sekundären, roten Plastiden aus (Cavalier-Smith 1999). Diese Theorie basierte auf der Annahme, dass der Prozess der sekundären Endosymbiose und die Etablierung der Plastide ein sehr komplexer Vorgang ist (Cavalier-Smith 1999). Außerdem ist die Morphologie der Plastiden äußerst ähnlich, da sie in diesen Organismen innerhalb des Endomembransystems (außer in den Apicomplexa) des Wirtes vorliegen (Cavalier-Smith 1999). Ein dritter Punkt dieser Argumentationskette ist die Pigmentzusammensetzung der zusammen gruppierten Organismen, welche alle Chlorophyll c synthetisieren (Cavalier-Smith 1999). Phylogenetische Analysen konnten zeigen, dass die Plastiden selbst unzweifelhaft roten Ursprungs sind, sofern sie nicht wie in einigen Dinoflagellaten, in tertiären oder seriellen Symbiosen ersetzt wurden (Hackett et al. 2007; Harper und Keeling 2003; Harper et al. 2005; Hehenberger et al. 2014; Janouskovec et al. 2010) (s. Abb. 1). Die Wirtsgenome unterstützen jedoch keinen monophyletischen Ursprung (Baurain et al. 2010; Burki et al. 2007; Burki et al. 2012b; Petersen et al. 2014). Daher wurde für die Organismen mit sekundären Plastiden roten Ursprungs eine neue Bezeichnung eingeführt, CASH (Cryptophyta, Alveolata, Stramenopile, Haptophyta) (Baurain et al. 2010; Petersen et al. 2014).

So werden die Stramenopilen inzwischen zusammen mit den Alveolaten (Apicomplexa, Ciliaten und Dinoflagellaten) und den Rhizaria, wozu auch die Chlorarachniophyten zählen, als monophyletische SAR-Klade (Stramenopile, Alveolata, Rhizaria) angesehen, wobei die Haptophyten als Schwestergruppe identifiziert werden konnten (Burki et al. 2007; Burki et al. 2012b; Burki et al. 2014; Burki et al. 2016; Cavalier-Smith 2010). Allerdings formen Cryptophyten



Der Verlust der Fähigkeit zur Photosynthese, wie in den Apicomplexa, welche eine reduzierte Plastide, den sogenannten Apicoplast enthalten, sowie der vollständige Verlust der Plastide, welche schließlich nur noch durch Gentransfer in den Wirtsnukleus nachgewiesen werden kann, erschweren die Analyse dieser Verwandtschaftsverhältnisse (Archibald 2009; Gould et al. 2008; Woehle et al. 2011). Des Weiteren zeigen Studien, dass viele plastidäre Gene von Diatomeen grünen Ursprungs sind (Deschamps und Moreira 2012; Moustafa et al. 2009). Eine erste Interpretation dieser Daten postulierte eine serielle Endosymbiose. Zunächst wurde eine Grünalge zur Plastide reduziert und später durch eine Rotalge ersetzt (Moustafa et al. 2009). Eine wahrscheinlichere Erklärung, welche in mehreren phylogenetischen Studien zu finden ist, erklärt den detektierten grünen Ursprung dieser Gene als phylogenetisches Artefakt, verursacht durch eine zu geringe Anzahl entsprechender für die Analyse notwendiger Sequenzen rhodophytischen Ursprungs oder durch lateralen Gentransfer (Burki et al. 2012a; Deschamps und Moreira 2012; Dorrell und Smith 2011). In einigen dieser Studien wird auf die Wichtigkeit der Auswahl der miteinander zu vergleichenden Sequenzen verwiesen, um die Belastbarkeit der errechneten Phylogenien zu erhöhen (Burki et al. 2012a; Burki et al. 2016). Betrachtet man die Gesamtheit der phylogenetischen Analysen, so ist die Chromalveolatentheorie wohl als falsch anzusehen, auch wenn die genauen Verwandtschaftsverhältnisse noch nicht endgültig geklärt werden konnten. Alternative, zunehmend komplexere Evolutionsmodelle, wurden in der Folge aufgestellt, die hier nicht im Detail wiedergegeben werden sollen (Baurain et al. 2010; Bodyl et al. 2009; Burki et al. 2007; Burki et al. 2012b; Petersen et al. 2014; Stiller et al. 2014; Zimorski et al. 2014). Tatsächlich kommen manche Autoren auch zu dem Schluss, dass man diese Verwandtschaftsverhältnisse möglicherweise nicht aufgrund der Phylogenie auflösen kann, sondern stattdessen die grundlegende Zellbiologie, also den Aufbau von Membranen und Proteintransportsystemen (s. 1.2) in Betracht ziehen sollte (Gould et al. 2015). Diese Annahme wird durch eine neuere Studie unterstützt, welche das Vorhandensein des SELMA-Komplexes in Linien mit roter sekundärer Plastide aufführt, um auf die komplexen Anpassungen zu verweisen, die bei der Etablierung eines Endosymbionten nötig sind (Kim et al. 2017). Moog et al. weisen auch auf den Einfluss des Symbionten auf den Wirt hin, da die Endosymbiose ein komplexes Zusammenspiel beider Partner erfordert (Moog et al. 2015).

1.2 Proteintransport in komplexe Plastiden rhodophytischen Ursprungs

1.2.1 Transport in das periplastidäre Kompartiment (PPC)

Um einen Endosymbionten als Organell zu etablieren, müssen neben den bereits beschriebenen Reduktionsereignissen auch neue Transport- und Stoffwechselwege zwischen Wirt und Symbiont entwickelt werden. Da die zuvor im Symbiontengenom kodierten Proteine nun im Wirtsgenom zu finden sind, werden sie in dessen Cytosol synthetisiert. Die Plastide liegt jedoch im Gegensatz zu primären Plastiden nicht im Cytosol vor, sondern deren äußerste Plastidenmembran befindet sich im Kontinuum mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) des Wirts. Daher wird sie auch als Chloroplasten-ER-Membran (cER) bezeichnet (Gibbs 1979; Gould et al. 2006; Gould et al. 2008; Kilian und Kroth 2005; Liu et al. 2016). Eine Ausnahme hiervon bilden die Apicomplexa, deren Apicoplast zwar von 4 Membranen umgeben ist, jedoch scheinbar frei im Cytosol vorliegt (Heiny et al. 2014). Die Plastide der Dinoflagellaten wurde hingegen um eine Membran reduziert (Cavalier-Smith 1999). Im Folgenden wird der Fokus auf den Transport von Proteinen in komplexe Plastiden mit 4 Membranen gelegt, deren äußerste Membran im Kontinuum mit ER ist. Die beiden äußeren Membranen, die cER-Membran, als auch die zweite Membran, welche von einer ER-Membran abstammen könnte, wird als periplastidäre Membran (PPM) bezeichnet und trennt das Wirts-ER vom ehemaligen Cytosol des Symbionten (Gould et al. 2015). In diesem Kompartiment, dem sogenannten PPC (periplastidäres Kompartiment) befindet sich in Cryptophyten und Chlorarachniophyten der Nukleomorph (Curtis et al. 2012). Die beiden inneren Membranen scheinen auf die Membranen der primären Plastiden zurückzugehen, eine Annahme, welche durch das Vorhandensein von TOC/TIC (*translocon of the outer/inner chloroplast membrane*) Homologen bekräftigt wird (Bullmann et al. 2010; Glaser et al. 2012; Sheiner et al. 2015; Stork et al. 2012; van Dooren et al. 2008). Abgesehen von Toc75 ist jedoch nichts über die dritte Membran in Diatomeen bekannt. Der Transport der im Wirtsgenom kodierten plastidären Proteine in komplexe Plastiden beginnt im Cytosol. Dort werden diese als Prä-Proteine mit einer zweiteiligen Zielsteuerungssequenz, der sogenannten BTS (*bipartite targeting sequence*), synthetisiert, welche aus einem klassischen Signalpeptid (SP) für kotranslationalen Import in das ER durch das Sec61-Translokion sowie einer nachfolgenden Transitpeptid-ähnlichen Sequenz (TPL, *transit peptide like*) besteht (Huesgen et al. 2013; Kilian und Kroth 2005; Lang et al. 1998; Liu et al. 2016). Im zur Zeit geltenden Transportmodell wird angenommen, dass das SP nach erfolgter Translokation abgespalten wird (Foth et al. 2003; Stork et al. 2012). Molekulare Versuche konnten nachweisen, dass die TPL-Sequenz auch in primären Plastiden zum Import führt, was für eine Ähnlichkeit der TPL-Sequenz zu herkömmlichen Transitpeptiden (TP) spricht (Lang et al. 1998; Patron und Waller 2007). Obwohl es keine konservierte TPL-Sequenz oder Länge gibt, konnte eine für den Transport notwendige positive Nettoladung der TPL oder eine Anreicherung hydroxlierter Aminosäuren,

analog zu TPs primärer Plastiden festgestellt werden (Felsner et al. 2010; Foth et al. 2003). Zusätzlich zu ihrer Funktion als Zielsteuerungssequenz für den Transport über die zweite Membran (PPM) ist die TPL wie auch in primären Plastiden dafür verantwortlich die Proteine falls nötig bis ins Stroma zu dirigieren. Sollen die Proteine ins Stroma weitertransportiert werden, so findet sich an der ersten Position der TPL-Sequenz eine aromatische Aminosäure oder ein Leucin, ansonsten verbleibt das Protein im PPC (Gruber et al. 2015; Stork et al. 2012). Der Transport in die Plastide selbst ist mit dem Transportmechanismus in primären Plastiden vermutlich ähnlich und wird durch TOC/TIC Homologe bewerkstelligt. Die Translokation über die PPM erfolgt durch einen von der ERAD-Maschinerie (***ER-associated degradation***) abgeleiteten Komplex, genannt SELMA (***symbiont specific ERAD-like machinery***) (Lau et al. 2015; Sommer et al. 2007; Stork et al. 2012). ERAD findet sich im ER des Wirts und ist für die Translokation falsch gefalteter Proteine aus dem ER-Lumen ins Cytosol zur dortigen Degradation zuständig. Auch der Symbiont besaß diese ERAD-Maschinerie und diese wurde schließlich während der gemeinsamen Evolution von Symbiont und Wirt zum Proteintransport über die PPM umgewandelt. Diese Anpassung führte auch zur Annahme, dass es sich bei der zweiten Membran in komplexen Plastiden möglicherweise nicht um die Plasmamembran des Wirts, sondern um eine symbiontische ER-Membran handelt (Gould et al. 2015; Sommer et al. 2007; Stork et al. 2012). Obwohl ERAD seine Substrate dem proteasomalen Abbau zuführt, konnte eine solche Funktion für SELMA nicht nachgewiesen werden, zudem konnte kein vollständiges Proteasom im PPC identifiziert werden (Stork et al. 2012). Aufgrund fehlender Lysinreste an den Positionen 48 und 63 scheint keine Polyubiquitinierung stattzufinden, welche jedoch notwendig ist um die Substrate dem proteasomalen Abbau zuzuführen (Stork et al. 2012). Allerdings muss eine Ubiquitinierung erfolgen, um die PPC-residente ATPase sCdc48 und ihre Co-Faktoren zu rekrutieren, welche die Energie für den Transport über die Membran hinweg bereitstellen (Lau et al. 2015). In welchem Maße die Komponenten von SELMA auch an der Unterscheidung zwischen PPC-residenten und für den weiteren Transport vorgesehenen Proteinen beteiligt sind, ist noch unklar (Hempel et al. 2009).

1.2.2 Transport in primäre Plastiden

Der weitere Transport in komplexe Plastiden aus dem PPC erfolgt ähnlich dem Transportmechanismus in primären Plastiden über TOC und TIC. Die Kernkomponenten in der äußeren Chloroplastenmembran bilden das ursprünglich prokaryotische TOC75, ein β -barrel Protein, und die eukaryoten GTPasen Toc159 und Toc34 (Zufferey et al. 2017) (s. Abb. 2). Toc34 und Toc159 besitzen jeweils eine cytosolische GTPase-Domäne. Toc159 besitzt zusätzlich dazu noch eine cytosolische saure Domäne (A-Domäne) als auch eine C-terminale M-Domäne, welche das Protein auf unbekannte Weise in der Membran verankert (Kessler et al. 1994). Diese drei Bestandteile bilden den Haupttransportweg in die primäre Plastide, wobei zu erwähnen ist, dass vor allem Proteine der äußeren Membran (**Outer Envelope Proteins**, OEPs) eine Vielzahl anderer Transportmechanismen entwickelt haben. Es wurde nachgewiesen, dass ein OEP über ein gewöhnliches Signalpeptid in die ER-Membran eingesetzt wird, der weitere Transport in die Plastide ist jedoch noch unbekannt (Villarejo et al. 2005). Im Gegensatz zu anderen plastidären Proteinen besitzen β -barrel Proteine (OMPs) gewöhnlich kein N-terminales Transitpeptid (siehe 1.2.3).

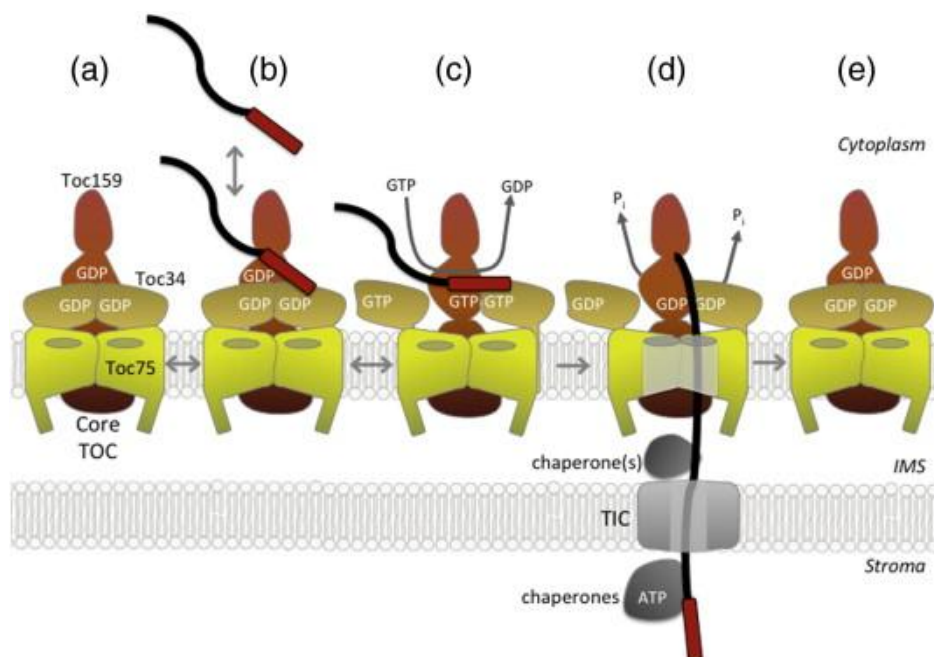


Abbildung 2: Darstellung der Erkennung von Prä-Proteinen durch Toc34 und Toc159: (a) Die Rezeptoren Toc34 und Toc159 liegen in ihrer inaktiven GDP-gebundenen Form vor. Dabei bildet Toc34 ein Homodimer. (b) In Anwesenheit eines Transitpeptids wird dieses innerhalb der GTPase-Domäne der Rezeptoren zunächst von Toc34 erkannt. (c) Die Bindung des Substrats induziert einen Austausch von GDP zu GTP, wodurch Toc34 dissoziiert und ein Heterodimer mit Toc159 bildet. (d) Die Hydrolyse von GTP führt wiederum zum Transfer des Prä-Proteins vom Rezeptor zu Toc75, welches den Transportkanal bildet. Der weitere Transport erfolgt dann über Toc75 und die TIC-Maschinerie. (e) Die Rezeptoren kehren zu ihrem ursprünglichen Zustand zurück und sind bereit für einen erneuten Importzyklus. IMS: *intermembrane space*, Core TOC: Kernkomponenten des TOC-Komplexes, *Cytoplasm*: Cytoplasma (Paila et al. 2015)

Neben der direkten Erkennung von Transitpeptiden durch die Rezeptoren Toc34/159 konnte auch nachgewiesen werden, dass cytosolische Faktoren die Prä-Proteine erkennen und dem Komplex bzw. anderen Rezeptoren der äußeren Chloroplastenmembran zum Import zuführen (Fellerer et al. 2011; May und Soll 2000; Qbadou et al. 2006). Hsp70 und ein 14-3-3 Protein, welche den *guidance complex* bilden, sowie weitere Chaperone sind an der Erkennung von Transitpeptiden im Cytosol beteiligt (Fellerer et al. 2011; May und Soll 2000; Loeffelholz et al. 2011; Qbadou et al. 2006). Die Chaperone binden die Prä-Proteine und leiten diese entweder direkt an Toc34 und Toc159 weiter, oder nutzen andere Chaperon-Rezeptoren in der äußeren Membran, wie Toc64 oder OEP61, welche dann das Substrat dem weiteren Transport zuführen (Fellerer et al. 2011; Loeffelholz et al. 2011; May und Soll 2000; Qbadou et al. 2006). In Abwesenheit von Prä-Proteinen liegen die Rezeptoren im gegenwärtigen Modell in ihrem inaktiven GDP-gebundenen Zustand als Homodimer vor. Anschließend bindet zunächst Toc34 innerhalb der GTPase-Domäne das Transitpeptid, was zu einem Austausch von GDP zu GTP führt und die Bildung eines Heterodimers von Toc34 und Toc159 führt (Becker et al. 2004). Durch die Hydrolyse von GTP wird das Substrat an TOC75 weitergereicht und der Transportvorgang wird fortgesetzt (Abb.2). Jedoch ist auch eine simultane Erkennung des Transitpeptids durch die beiden GTPasen möglich, da sie unterschiedliche Motive innerhalb des Transitpeptids erkennen (Becker et al. 2004). Der weitere Transport wird unter anderem durch eine Interaktion von Tic22 im sogenannten Intermembranraum (IMS, *intermembrane space*) vollzogen, einem Chaperon welches eine Misslokalisierung in den IMS verhindert (Glaser et al. 2012). Weitere Hauptkomponenten des TIC-Translokons sind Tic20/21, Tic40 und Tic110. Man geht davon aus, dass Tic20 und Tic21 an der Kanalbildung beteiligt sind, jedoch ist die Funktion von Tic21 nicht abschließend geklärt (Chen et al. 2002b; Teng et al. 2006). Tic110 kann ebenfalls Transitpeptide binden und ragt mit dem C-Terminus ins Stroma der Plastide, dort dient es zusammen mit Tic40 möglicherweise als Dockingstelle für stromale Chaperone (Chou et al. 2006; Inaba et al. 2003). Nachdem kürzlich weitere Komponenten entdeckt wurden, ergibt sich die Frage, ob diese möglicherweise noch nicht identifizierte Teile eines vollständigen TIC-Translokons sind oder diese Komponenten das eigentliche Translokons ausmachen und der Komplex um Tic110 herum nur der Organisation im Stroma dient (Kikuchi et al. 2013). Die stromalen Chaperone stellen dann bei diesem Prozess die Energie zur Verfügung, um die Proteine ins Stroma zu transportieren (Akita et al. 1997; Chou et al. 2006). Dort wird das Transitpeptid schließlich von einer stromalen Peptidase entfernt (Richter und Lamppa 1998).

1.2.3 Transport von Proteinen in die äußere Membran von primären Plastiden

Wie bereits erwähnt, sind Proteine, die in der äußeren Membran von Plastiden oder auch von Mitochondrien gefunden werden, meistens nicht mit einer abspaltbaren N-terminalen Zielsteuerungssequenz ausgestattet (Li und Chen 1996, 1997). Ausnahmen hiervon bilden Toc159 und Toc75, welche eine solche Sequenz enthalten (Kessler et al. 1994; Li und Chen 1996). Tatsächlich besitzt Toc75 eine zweigeteilte Zielsteuerungssequenz, welche zunächst wie ein Transitpeptid für eine stromale Lokalisation wirkt, jedoch wird nach der Entfernung des Transitpeptids im Stroma noch während des Transportvorgangs der zweite Teil der Zielsteuerungssequenz zugänglich und führt zu einer Blockierung des weiteren Transports in das Stroma (Inoue und Keegstra 2003; Tranel und Keegstra 1996). Auch für das Membranprotein OEP14 konnte eine N-terminale Zielsteuerungssequenz nachgewiesen werden (Lee et al. 2001; Li und Chen 1996). Weitere Analysen legten einen ebenfalls über Toc75 laufenden Transportweg nahe (Tu et al. 2004). Studien identifizierten eine Transmembrandomäne mit positiv geladenen Flankenregionen als Zielsteuerung für die äußere Membran (Bae et al. 2008; Lee et al. 2001; Lee et al. 2004). Zwei Proteine (AKR2A/AKR2B), welche einen *Ankyrin-repeat* enthalten, konnten als cytosolische Faktoren identifiziert werden, welche bei der Erkennung dieses Proteins und dessen Transport beteiligt sind (Bae et al. 2008).

Neben N-terminaler Signale wurden jedoch auch Proteine mit C-terminalen Signalen entdeckt, unter anderem Toc34, Toc33 und OEP9 (Dhanoa et al. 2010). Diese drei OEPs interagieren ebenfalls mit AKR2A, benötigen jedoch unterschiedliche Rezeptoren, um in die äußere Membran integriert zu werden, da sie zwar ähnliche, aber dennoch unterschiedliche Zielsteuerungssequenzen zu enthalten scheinen (Dhanoa et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Proteine der äußeren Chloroplastenmembran mit Signalanker oder auch mit einem *Tail-Anchor* noch am Ribosom durch den N-Terminus von AKR2A erkannt und durch die *Ankyrin-repeat*-Domäne zur äußeren Chloroplastenmembran geleitet werden (Kim et al. 2014; Kim et al. 2015). Zusätzlich zu den hier genannten Proteinen, welche bis auf Toc75 eine α -helicale Transmembrandomäne aufweisen, gibt es β -barrel Proteine, welche durch einen anderen Mechanismus in die Membran integriert werden und charakteristisch für die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten sind (Kim et al. 2007). Dieser Mechanismus wird im Abschnitt 1.3.2 erläutert.

1.3 Assemblierung von β -barrel Proteinen in Bakterien und Organellen

1.3.1 Der BAM-Komplex Gram-negativer Bakterien

β -barrel Proteine (**Outer Membrane Proteins**, OMPs) werden in der Membran nicht durch klassische α -Helices verankert, sondern bilden eine tonnenförmige Struktur mit anti-parallel angeordneten β -Faltblättern aus, welche dann durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden. Die Anzahl dieser Proteine ist wesentlich geringer als die α -helicaler Transmembranproteine und sie erfüllen wichtige Rollen beim Transport von Substraten über die Membranen hinweg und bei der Porenbildung (Hayat und Elofsson 2012). Bisher wurden 29 nicht homologe Superfamilien von β -barrel Proteinen entdeckt. Einige konnten als Proteasen, Lipasen, Adhesine, Toxine oder auch als Assemblierungsfaktoren charakterisiert werden (Roy Choudhury und Novic 2015). In Gram-negativen Bakterien werden diese Proteine durch den BAM-Komplex (**β -barrel Assembly Machinery**) in die äußere Membran integriert (s. Abb. 3).

Der genaue Mechanismus ist bislang jedoch ungeklärt und es existieren verschiedene Erklärungsmodelle. Der BAM-Komplex besteht aus fünf verschiedenen Proteinen. Zentral ist BamA, ein Protein der Omp85-Familie, welches durch eine C-terminale, 16-strängige β -barrel Domäne in der Membran verankert ist und in *E. coli* fünf N-terminale, im Periplasma gelegene **Polypeptide Transport-associated**-Domänen (POTRA) besitzt (Iadanza et al. 2016; Kim et al. 2007). Diese Domänen besitzen eine charakteristische Struktur von β -Faltblättern und α -Helices in der Reihenfolge β - α - β - β (Kim et al. 2007). Die Anzahl der POTRA-Domänen ist dabei abhängig von der Spezies und die Domänen nehmen offensichtlich unterschiedliche Funktionen wahr, da die Deletion einzelner Domänen zu einem letalen Phänotyp führen kann. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die POTRA-Domänen drei bis fünf essentiell sind, wohingegen in *N. meningitidis* nur POTRA5 für den Erhalt der Funktion nötig ist (Arnold et al. 2010; Bos et al. 2007; Kim et al. 2007). Auch scheint die β -barrel Domäne von BamA selbst essentiell für die Funktion des Komplexes zu sein, da ein Austausch mit einer β -barrel Domäne der Phospholipase A die Funktion nicht erhalten konnte (Bos et al. 2007). Die POTRA-Domänen scheinen sowohl mit periplasmatischen Chaperonen wie SurA und Skp, also auch mit den Lipoproteinen BamB, BamC, BamD und BamE zu interagieren (Kim et al. 2007). Außerdem sind sie an einem als β -augmentation bezeichneten Prozess beteiligt (Heuck et al. 2011; Kim et al. 2007). Dabei bildet ein β -Faltblatt der POTRA-Domäne ein Gerüst, an welchem sich die β -Faltblätter des ungefalteten OMPs ausrichten können. BamA kann durch die POTRA-Domänen chaperongebundene OMPs anhand eines spezifischen Signals im äußersten C-Terminus, genauer im letzten β -Strang des Proteins, erkennen (Knowles et al. 2008; Lehr et al. 2010; Struyvé et al. 1991).

BamB, BamC, BamD und BamE sind die restlichen Komponenten des Komplexes. Es handelt sich dabei jeweils um Lipoproteine, welche über ihren N-Terminus an der inneren Lipidschicht der äußeren Membran verankert sind (Kim et al. 2011a; Kim et al. 2011b; Kim und Paetzel 2011; Sandoval et al. 2011). Essentielle Teile dieses Komplexes sind BamA und BamD, deren Deletion stets letal ist (Kim et al. 2011b). BamB formt einen 8-strahligen β -Propeller und steht in direktem Kontakt zu BamA über die dritte POTRA-Domäne (Kim et al. 2007; Kim und Paetzel 2011). Es wird angenommen, dass es BamA bei der Erkennung von ungefalteten OMPs unterstützt, da eine Deletion nur ähnliche Defekte wie die Deletion des Chaperons SurA zeigt (Heuck et al. 2011). Neue Kristallstrukturen des Komplexes legen nahe, dass BamB außerdem die Konformation von BamA reguliert (Gu et al. 2016). BamC, BamD und BamE bilden zusammen eine Einheit, welche über die zentrale Komponente BamD mit BamA in Verbindung steht (Sandoval et al. 2011). BamD interagiert mit POTRA5 von BamA und unterstützt vermutlich durch seine 5 TPR-Domänen die Erkennung von OMPs, wohingegen BamC und BamE den Gesamtkomplex zu stabilisieren scheinen (Endo et al. 2011; Kim et al. 2007; Sandoval et al. 2011). Allerdings wurde an der vermuteten Bindestelle für die OMPs eine Interaktion von BamC mit BamD nachgewiesen, welche die vorhergesagte Substraterkennung zumindest mit dem postulierten Mechanismus unmöglich macht (Kim et al. 2011a).

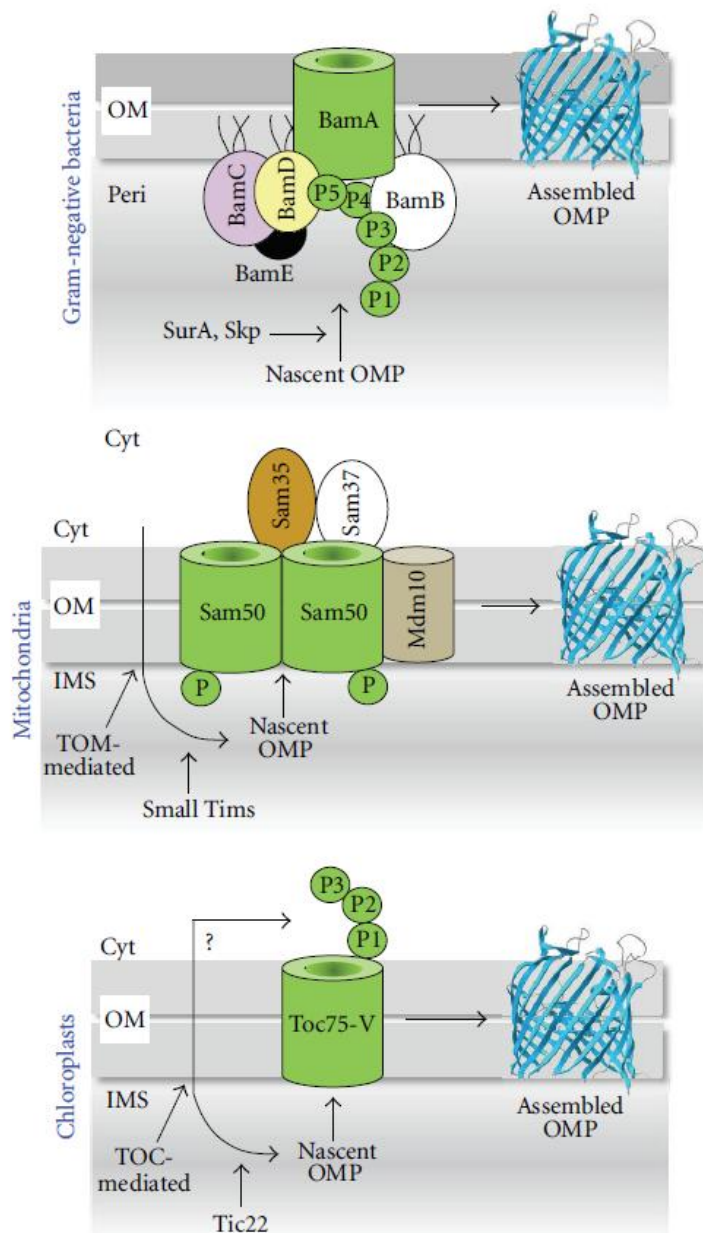


Abbildung 3: Darstellung der β -barrel Assemblierung in Gram-negativen Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten: Im oberen Teil der Abbildung wird sowohl der BAM-Komplex in Gram-negativen Bakterien (in diesem Fall *E. coli*) als auch der Assemblierungsprozess von β -barrel Proteinen gezeigt. Neu synthetisierte OMPs wurden aus dem Cytoplasma (Cyt) über das Sec-Translokon in das Periplasma transportiert. Dort werden die ungefalteten Proteine (*nascent OMPs*) durch periplasmatische Chaperone (SurA, Skp) gebunden und an den BAM-Komplex, bestehend aus dem integralen β -barrel Protein BamA und den Lipoproteinen BamB-E, übergeben. Dabei spielen die POTRA-Domänen (P1-P5) eine wichtige Rolle bei der Substraterkennung und -faltung. Durch einen noch ungeklärten Mechanismus wird das OMP schließlich in die Membran integriert. Im mittleren Teil der Abbildung wird dieser Prozess in Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* dargestellt. β -barrel Proteine werden aus dem Cytosol über Tom40 in den Intermembranraum (IMS) importiert und durch das BamA-Homolog SAM50 (*Sorting and Assembly Machinery* 50 kDa) und seine Kofaktoren Sam35/37 sowie Mdm10 aus dem IMS in die Membran integriert (siehe Abschnitt 1.3.2). An diesem Prozess sind Chaperone des IMS (*small Tims*) beteiligt. Im unteren Teil der Darstellung ist der Mechanismus der Assemblierung von β -barrel Proteinen in Chloroplasten dargestellt. Das BamA-Homolog Toc75-V oder OEP80 wird als zentrale Komponente dieses Komplexes angesehen, jedoch wurden noch keine weiteren Faktoren gefunden. Es ist jedoch anzunehmen, dass der Prozess ähnlich wie der in Mitochondrien abläuft und daher die Proteine zunächst über Toc75 in den IMS importiert und unter Beteiligung von Tic22 an Toc75-V weitergeleitet werden. In dieser Abbildung ist Toc75-V mit den N-terminalen POTRA-Domänen im Cytosol abgebildet, tatsächlich existieren widersprüchliche Daten zur Orientierung von Toc75-V in Chloroplasten. Neuere Studien gehen von einer Orientierung der POTRA-Domänen in den IMS aus. OM: outer membrane (Misra 2012).

Trotz vieler Studien bleibt der Mechanismus der Assemblierung von OMPs weiterhin ungeklärt und es existieren verschiedene Erklärungsmodelle des Prozesses. In allen Modellen beginnt die Assemblierung mit dem Export neu synthetisierter OMPs aus dem Cytoplasma über das Sec-Translokton in das Periplasma (Noinaj et al. 2014). Dort werden die ungefalteten Proteine durch periplasmatische Chaperone (SurA, Skp) gebunden und zum BAM-Komplex transportiert (Sklar et al. 2007; Volokhina et al. 2011) (s. Abb. 3). Dabei konnte gezeigt werden, dass die N-Domäne von SurA für die Bindung an neu synthetisierte OMPs nötig ist. Außerdem werden sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus von OMPs durch das Chaperon erkannt (Wang et al. 2016). Eine Interaktion mit BamA erfolgt dann über die P2-Domäne (Wang et al. 2016). Jedoch scheinen unterschiedliche Transportwege zu existieren, da es auch OMPs gibt, welche nicht mit SurA interagieren (McMorran et al. 2013). Die Substrate werden dann von den POTRA-Domänen gebunden, wobei BamB eine unterstützende Rolle einnimmt. Der genaue Integrationsprozess in die Membran ist bis auf die Übergabe der OMPs an den Komplex noch ungeklärt. An dieser Stelle seien nur zwei der derzeit als am wahrscheinlichsten geltenden Mechanismen kurz beschrieben. Für weitere Informationen sei auf ein Review verwiesen, welches vier Erklärungsmodelle miteinander vergleicht (Kim et al. 2012). Kim et al. postulierten ein Modell, das als *budding model* bezeichnet wird. Dabei bildet das zu transportierende OMP innerhalb des β -barrels von BamA seine eigene β -barrel Domäne aus, indem es den ersten und letzten β -Strang von BamA, welche nur durch relativ schwache Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind, als Gerüst für die Faltung nutzt. Die daraus resultierende seitliche Öffnung von BamA führt dann nach erfolgreicher Faltung zur Integration in die äußere Membran (Gu et al. 2016; Kim et al. 2012; Noinaj et al. 2014). Im zweiten Modell führt der BAM-Komplex eine lokale Störung der Membran herbei und durch die unmittelbare Nähe des zu assemblierenden OMPs kann dieses spontan selbst in die instabile äußere Membran integriert werden, was als BamA-unterstütztes Modell bezeichnet wird (Kim et al. 2012; Noinaj et al. 2017).

1.3.2 Assemblierung von β -barrel Proteinen in Mitochondrien und Plastiden

Sowohl Mitochondrien als auch Plastiden sind Zellorganelle mit einem endosymbiontischen Ursprung. Sie gingen aus prokaryotischen Organismen hervor und zeichnen sich daher durch das Vorhandensein von β -barrel Proteinen aus. Der Transport dieser Proteine in die Organellen ist weniger gut erforscht als die Assemblierung in Gram-negativen Bakterien, aber den Transportwegen ist zumindest eine zentrale Komponente gemeinsam. In allen drei Fällen existiert ein Protein der Omp85-Familie, welches eine zentrale Rolle einnimmt (s. Abb. 3). Im Falle von Mitochondrien handelt es sich dabei um Sam50 und in Chloroplasten um OEP80, welche allerdings nicht fünf, sondern nur eine beziehungsweise drei POTRA-Domänen aufweisen (Day et al. 2014; Habib et al. 2005; Habib et al. 2007; Inoue und Potter 2004). Im Gegensatz zu bakteriellen Systemen scheint die POTRA-Domäne von Sam50 trotz widersprüchlicher Daten nicht an der Erkennung von OMPs beteiligt zu sein, sondern eher eine Rolle bei der Freisetzung der assemblierten OMPs zu spielen (Habib et al. 2007; Kutik et al. 2008; Stroud et al. 2011). Sowohl die Topologie als auch der Transport von OEP80 sind zur Zeit nicht vollständig geklärt (Day et al. 2014). So gibt es eine Studie, welche zeigt, dass sowohl Toc75 als auch OEP80 mit dem N-Terminus ins Cytosol ragen, wohingegen andere Experimente eine gegensätzliche Orientierung in den Intermembranraum zeigen (Paila et al. 2016; Sommer et al. 2011). Aufgrund der fehlenden Daten wird hier nur kurz der Mechanismus in Mitochondrien vorgestellt. Die Daten beruhen dabei zumeist auf Experimenten in Hefe. Da gezeigt werden konnte, dass plastidäre OMPs auch in Mitochondrien assembliert werden, wird eine starke Konservierung des Mechanismus angenommen (Ulrich et al. 2012). Außerdem sind Mitochondrien in der Lage bakterielle OMPs in ihrer nativen Faltung zu assemblieren, was ebenfalls für eine Konservierung des Prozesses spricht (Ulrich et al. 2014). Der SAM-Komplex in Mitochondrien, welcher für die Integration und Assemblierung von mitochondrialen β -barrel Proteinen verantwortlich ist, besteht aus den vier Komponenten Sam50, Sam35, Mdm10 und Sam37, auch wenn Letzteres nicht essentiell ist (Stroud et al. 2011; Wenz et al. 2015). Dabei bilden Sam50, Sam35 und Sam37 den Kernkomplex. Mdm10 wurde jedoch nur in Fungi und einigen Protisten identifiziert (Flinner et al. 2013). Sam35 scheint an der Erkennung von mitochondrialen OMPs beteiligt zu sein, wohingegen Sam37 eher eine Funktion bei der Verbindung des TOM-Komplexes und des SAM-Komplexes und der Freisetzung der assemblierten Proteine einnimmt (Kutik et al. 2008; Wenz et al. 2015). Sam35 wird durch seine Interaktion mit Sam50 in der Membran verankert und lediglich N- und C-Terminus befinden sich auf der cytosolischen Seite der äußeren Mitochondrienmembran (Kutik et al. 2008). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sam35 durch Sam50 in der Membran verankert wird und die durch den TOM-Komplex in den Intermembranraum transportierten OMPs anhand ihres β -Signals im letzten β -Strang des Proteins erkannt werden. In Verbindung mit Sam37 wird

dann die Interaktion des SAM-Komplexes mit dem TOM-Komplex eingeleitet (Kutik et al. 2008; Wenz et al. 2015). Im Intermembranraum interagieren die OMPs mit Chaperonen, welche den Transfer zum SAM-Komplex unterstützen (Habib et al. 2005; Habib et al. 2007; Stroud et al. 2011). Mdm10 ist nicht Teil des Kernkomplexes, wird aber in einem Teil der SAM-Komplexe gefunden und ist an der Assemblierung des TOM-Komplexes beteiligt (Ellenrieder et al. 2016; Meisinger et al. 2004; Meisinger et al. 2006). Die Funktion von Mdm10 innerhalb des Komplexes ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Ein Modell postuliert, dass Mdm10 hauptsächlich an der Biogenese von Tom22 beteiligt ist, was schließlich zur vollständigen Assemblierung des TOM-Komplexes führt, jedoch nicht an der Assemblierung weiterer OMPs beteiligt ist (Becker et al. 2011). Abgesehen von seiner Funktion im Proteintransport scheint der SAM-Komplex auch mit Faktoren in der inneren Membran zu interagieren und so die Formation der Cristae zu beeinflussen (Ott et al. 2012).

1.4 Das endoplasmatische Retikulum und die *Unfolded Protein Response*

1.4.1 Strukturen und Subdomänen des endoplasmatischen Retikulums

Das endoplasmatische Retikulum (ER) kann bereits morphologisch in verschiedene Bereiche eingeteilt werden. So kann das ER in drei größere Kompartimente unterteilt werden, das raue ER (rER), das glatte (sER) sowie die Kernhülle, deren äußere Membran mit dem ER im Kontinuum vorliegt (Rolls et al. 2002). Diese Subkompartimente erfüllen verschiedene Funktionen, so ist das rER, das vor allem durch die Anwesenheit von Ribosomen charakterisiert wird, zuständig für Proteinsynthese und kotranslationalen Import, während das sER vermehrt Faktoren für Transport und Lipidsynthese aufweist (Görlisch et al. 1992; Joshi et al. 2016; Rolls et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass sich in Neuronen von *C. elegans* einige Proteine vermehrt im rER finden, was die unterschiedlichen Rollen der beiden Kompartimente unterstreicht (Rolls et al. 2002).

Die Kernhülle oder *Nuclear Envelope* (NE) dient der Trennung von DNA- und RNA-Synthese und -prozessierung (Denais et al. 2016). Außerdem schützt sie das Genom vor cytosolischen Faktoren. Für den Export und Import von Substraten sind Kernporenkomplexe (NPC = *Nuclear Pore Complex*) vorhanden, welche sowohl die innere als auch die äußere Kernhülle durchbrechen (Peyro et al. 2015). Die innere Kernhülle interagiert mit der Lamina, einer Struktur, welche von Laminen um das Chromatin herum gebildet wird (Aebi et al. 1986). Mehrere Studien konnten auch die Bedeutung von Laminen, welche zu den intermediären Filamenten zählen, für die Bildung der Kernhülle nachweisen (Taniura et al. 1995; Ulitzur et al. 1992; Ulitzur et al. 1997; Ulitzur und Gruenbaum 1989; Xie et al. 2016). Neuere Studien legen außerdem nahe, dass auch

die NPCs mit Chromatin interagieren (Courjol et al. 2017). Neben dieser Spezialisierung konnte in einigen Zelltypen auch ein sogenanntes nucleoplasmatisches Retikulum nachgewiesen werden. Dieses formt Invaginationen und tubuläre Strukturen der inneren Kernhülle (Echevarría et al. 2003; Fricker et al. 1997). Für weitere Informationen hierzu sei auf ein Review von Malhas et al. verwiesen (Malhas et al. 2011).

Abgesehen von diesen zum Teil bereits im Mikroskop sichtbaren Strukturen, kann das ER auch in kleinere funktionale Subdomänen aufgeteilt werden. So existieren Kontaktstellen zwischen dem ER und anderen Organellen oder Membranen. Hier wird kurz auf die Assoziation der ER-Membran und Mitochondrien eingegangen. Diese Kontaktstellen scheinen spezifische Interaktionen wie zum Beispiel Lipidaustausch zu ermöglichen (Kannan et al. 2017; Lahiri et al. 2014; Stone und Vance 2000). So konnte gezeigt werden, dass Enzyme der Lipidsynthese vermehrt an Kontaktstellen des ERs mit Mitochondrien lokalisieren (Stone und Vance 2000). Auch eine Verbindung des Calciumstoffwechsels der beiden Organellen konnte nachgewiesen werden (Szabadkai et al. 2006). Weitere Faktoren, welche an diesen Kontaktstellen lokalisieren, sind Komponenten des ERMES-Komplexes (*Endoplasmic Reticulum Mitochondria Encounter Structure*), welcher unter anderem auch Mdm10 involviert und am Austausch diverser Stoffe beteiligt ist (AhYoung et al. 2017; Ellenrieder et al. 2016; Flinner et al. 2013).

Das ER besitzt jedoch auch Subdomänen, welche nicht durch eine Kontaktstelle von Membranen oder die Anwesenheit von Ribosomen angezeigt werden. Als Beispiele für diese identifizierten Subdomänen seien ER *exit sites* und das peroxisomale ER genannt. Sekretorische Proteine verlassen das ER an sogenannten ER *exit sites*, Regionen an welchen COPII-Vesikel gebildet werden und keine Ribosomen zu finden sind (Bannykh et al. 1996; Saito et al. 2009). Zwei wichtige Faktoren für die Bildung dieser Bereiche sind das cytosolische Sec16 und das ER-Membranprotein Tango1 (Liu et al. 2017; Maeda et al. 2017; Yorimitsu und Sato 2012). Zusammen gruppieren diese beiden Proteine alle notwendigen Faktoren, unter anderem Sar1, Sec23 und Sec24, für die COPII-Vesikel-Bildung. Diese zwei Proteine sind vor allem an der Bildung von Vesikeln für den Transport von sehr großen Proteinen wie Kollagen beteiligt (Liu et al. 2017). Ein anderes für *exit sites* spezifisches Protein ist Sec12, ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor, welcher Sar1 zur ER-Membran rekrutiert und aktiviert (McMahon et al. 2012; Montegna et al. 2012; Saito et al. 2014). Anschließend erfolgt der Transport zum Golgi-Apparat und anderen Zielen innerhalb oder außerhalb der Zelle (Bannykh et al. 1996). Es existieren zwei Isoformen von Tango, welche unabhängig voneinander makromolekulare Komplexe für den Export bilden (Maeda et al. 2016). D'Arcangelo et al. beschreiben den genauen Mechanismus und die beteiligten Export-Faktoren in ihrer Arbeit (D'Arcangelo et al. 2013). Der COPII-Komplex (*coat protein II complex*) ist außerdem

auch an der Sortierung von missgefalteten Proteinen beteiligt, welche in eine weitere Subdomäne des ERs transportiert werden, bevor sie schließlich durch die ERAD-Maschinerie ins Cytosol exportiert werden (Kamhi-Nesher et al. 2001; Kakoi et al. 2013). Diese ERAC (**ER-associated compartment**) genannte Subdomäne beinhaltet teilweise auch Regionen, welche durch vorhandene Marker als *exit site* charakterisiert werden könnten, was jedoch auch auf die zwei Funktionen, welche der COPII-Komplex erfüllt, zurückzuführen sein könnte (Kakoi et al. 2013).

Peroxisomale Membranproteine, welche zunächst in die ER-Membran inseriert wurden, werden durch verschiedene Faktoren im sogenannten peroxisomalen ER oder auch pER angereichert, bevor der Transport zu den Peroxisomen erfolgt (Agrawal et al. 2016; Karnik und Trelease 2007; Mayerhofer et al. 2016). Dieser Transportweg wurde bereits für Hefe, Pflanzen und Mammalia gezeigt (Hoepfner et al. 2005; Karnik und Trelease 2005, 2007; Kim et al. 2006; Mullen et al. 1999; van der Zand et al. 2010). Die Peroxisomen werden dabei *de novo* gebildet. Sogenannte prä-peroxisomale Vesikel knospen anschließend aus dem pER und generieren das Peroxisom oder fusionieren mit einem bereits existierenden Peroxisom (Agrawal et al. 2016). In Pflanzen deuten die Daten jedoch eher auf eine Art durch das ER assistierte Teilung der Peroxisomen hin, da sich die Faktoren, welche für eine *de novo* Bildung der Peroxisomen notwendig sind, anders verhalten als in Mammalia oder Hefe (Barton et al. 2013). Eine genauere Beschreibung dieses Prozesses kann in den Arbeiten von Agrawal et al. oder Mayerhofer gefunden werden (Agrawal et al. 2016; Mayerhofer 2016).

In Organismen mit sekundären Plastiden roten Ursprungs existiert eine weitere spezialisierte Region des ERs. Wie bereits in den Kapiteln 1.1 und 1.2 erläutert, besitzen einige Organismen Plastiden, welche innerhalb des Endomembransystems vorliegen. In manchen Fällen ist dabei die äußerste Membran sogar dem ER gleichzusetzen und wird als Chloroplasten-ER (cER) bezeichnet (Liu et al. 2016). In Diatomeen liegt die cER-Membran im Kontinuum mit der äußeren Kernhülle vor und diese wiederum mit dem ursprünglichen ER des Wirtes (*hostER*, hER). Durch die Lokalisation verschiedener ER-Membranproteine wurden unterschiedliche Kompartimente des ERs sichtbar gemacht. Liu et al. lokalisierten dabei eine Untereinheit des Sec61-Translocons, eine Komponente der ERAD-Maschinerie und zwei Aquaporine, welche eine unterschiedliche Verteilung aufwiesen (Liu et al. 2016). Liu et al. legten sich noch nicht auf eine tatsächliche Kompartimentierung fest, doch deuten die Daten auf eine mögliche Spezialisierung verschiedener Bereiche des ERs hin. Möglicherweise erfüllen cER und hER verschiedene Aufgaben und das cER besitzt nicht die notwendigen Faktoren, um abgesehen von Proteinimport und Qualitätskontrolle (Sec61, hDer1-2) andere ER-spezifische Aufgaben zu erfüllen. Betrachtet man Proteine, welche für die Photosynthese benötigt werden, so zeigt sich abhängig von der Tageszeit ein

unterschiedliches Expressionsmuster. Tagsüber muss eine große Anzahl von Proteinen durch das cER in die Plastide importiert werden, wohingegen dies in den Nachtstunden nicht der Fall ist. Ein solches Muster wird für das hER nicht erwartet. Dies führte zur Annahme, dass sich cER und hER zumindest in Hinsicht auf die vorhandenen Qualitätskontrollen und deren enzymatische Aktivitäten unterscheiden könnten.

1.4.2 Die *Unfolded Protein Response*

Das ER ist unter anderem verantwortlich für die korrekte Faltung von sekretorischen Proteinen und besitzt eine Reihe von Sensoren, welche der Aufrechterhaltung der Homöostase dienen (Chen et al. 2002a; Gardner und Walter 2011). Diese Rezeptoren werden gemeinhin als Auslöser und Sensoren der *Unfolded Protein Response* (UPR) zusammengefasst. Es handelt sich dabei um ER-Membranproteine, welche Störungen der Proteinfaltung registrieren und Gegenmaßnahmen einleiten. Die verfügbaren Rezeptoren sind dabei jedoch vom Organismus abhängig. So gibt es Unterschiede zwischen *Saccharomyces cerevisiae*, Metazoa, Pflanzen und Protisten, welche in der folgenden Quelle zusammengefasst werden (Hollien 2013). In den Metazoa findet sich ein vollständiger Satz aller bekannter Rezeptoren: ATF6 (*Activating transcription factor 6*), IRE1 (*Inositol-requiring kinase 1*) und PERK (*Protein kinase RNA-like ER Kinase*). Wohingegen Pflanzen nur IRE1 und zwei bZIPs (*basic leucine zipper protein*), welche ATF6 entsprechen, besitzen und *Saccharomyces cerevisiae* nur IRE1 aufweist (Gosline et al. 2011; Kimmig et al. 2012; Zhang et al. 2015) (s. Abb. 4).

1.4.2.1 *Activating transcription factor 6*

Der UPR-Rezeptor ATF6 oder Homologe konnten in Metazoa und Pflanzen nachgewiesen werden. Unter normalen Bedingungen liegt ATF6 als ER-Membranprotein vor, dessen C-Terminus innerhalb des ER-Lumens liegt (Haze et al. 2001). Dort interagiert dieser mit dem luminalen Chaperon BiP (*Binding Protein*) (Shen et al. 2002). Im Falle einer Aktivierung durch ungefaltete Proteine, dissoziiert BiP von ATF6 und die luminal Domäne wird frei. Sie erkennt ER-Stress und es erfolgt eine Translokation in den Golgi-Apparat (Liu et al. 2007; Sato et al. 2011; Shen et al. 2002). Dort wird ATF6 durch zwei Proteasen innerhalb seiner Membrandomäne prozessiert, wodurch der N-Terminus frei wird und im Kern Zielgene der UPR reguliert (Kobylewski et al. 2017; Ye et al. 2000; Yoshida et al. 1998; Yoshida et al. 2000). Auch in Pflanzen konnten Faktoren gefunden werden, welche ATF6 entsprechen, und dieselbe Funktion erfüllen (Hayashi et al. 2013; Iwata et al. 2017; Le Sun et al. 2013; Liu et al. 2007; Liu und Howell 2010; Srivastava et al. 2013).

1.4.2.2 Inositol-Requiring Kinase 1

In vielen Eukaryoten wurde IRE1 als ein wichtiger Faktor der UPR gefunden. IRE1 besitzt eine N-terminale luminaire Domäne sowie eine cytosolische Serin/Threonin-Kinase-Domäne und eine Endo-Ribonuclease-Domäne (RNase-Domäne) (Gardner und Walter 2011; Guo und Polymenis 2006; Wakasa et al. 2012). Zunächst liegt IRE1 als Monomer vor. Die ER-luminaire Domäne wird durch BiP gebunden, welches die Aktivität von IRE1, ATF6 und PERK reguliert (Bertolotti et al. 2000). Ursprünglich dachte man, dass IRE1 bereits durch die fehlende Interaktion mit BiP im Falle von ER-Stress aktiviert wird. Jedoch konnten neuere Studien zeigen, dass BiP eher als Repressor und Regulator der Aktivität von IRE1 dient (Gardner und Walter 2011; Ishiwata-Kimata et al. 2013; Pincus et al. 2010). Erst durch die fehlende Interaktion mit BiP kann IRE1 aktiviert werden. Nachdem BiP nicht mehr an IRE1 bindet, dimerisiert IRE1. Die dimerisierten luminalen Domänen sind dann in der Lage ungefaltete Proteine direkt zu binden und IRE1 wird vollständig aktiviert (Credle et al. 2005; Gardner und Walter 2011; Pincus et al. 2010). IRE1 oligomerisiert und es kommt zur Autophosphorylierung durch die Kinase-Domänen, was wiederum die RNase-Domäne aktiviert (Credle et al. 2005; Lee et al. 2008). IRE1 spleißt die mRNA eines bZIP-Transkriptionsfaktors unkonventionell, welcher dadurch funktional und in den Nukleus transportiert wird. Je nach Organismus wurde der Transkriptionsfaktor unterschiedlich benannt: Xbp1 in Mammalia, Hac1 in *Saccharomyces cerevisiae* und bZIP60 in Pflanzen. Dort reguliert er die Expression von UPR Zielgenen, wie zum Beispiel Chaperonen und ERAD-Komponenten, um die Homöostase wiederherzustellen (Acosta-Alvear et al. 2007; Hooks und Griffiths-Jones 2011; van Anken et al. 2014) (s. Abb. 4). In Pflanzen wird durch das Spleißen eine Verschiebung des Leserahmens verursacht, welche dazu führt, dass das mature Protein seine einzige Transmembrandomäne verliert. Dadurch kann der mit einer Kernzielsteuerungssequenz ausgestattete Transkriptionsfaktor schließlich seine Funktionen im Kern erfüllen (Ye et al. 2013; Zhang et al. 2015). Die durch den Transkriptionsfaktor beeinflussten Gene weisen in ihren Promotorregionen Signale auf, welche als (*plant specific*) *unfolded-protein-response element* 1 und 2 (pUPRE) bezeichnet werden (Hayashi et al. 2013; Yoshida et al. 1998). Das Intron des Transkriptionsfaktors ist in vielen untersuchten Organismen konserviert, jedoch unterscheidet sich die Länge des Introns in *S. cerevisiae* und verwandten Spezies von der in Metazoa und anderen Fungi (Frost et al. 2012; Hooks und Griffiths-Jones 2011). Zum Teil wurden sowohl Hac1 als auch die spezifischen Strukturen, welche für das unkonventionelle Spleißen notwendig sind, verloren (Frost et al. 2012; Hooks und Griffiths-Jones 2011). Eine Studie zeigte, dass *Schizosaccharomyces pombe* scheinbar kein Ortholog von Hac1 besitzt und stattdessen andere Faktoren, welche an der Proteinfaltung beteiligt sind, durch IRE1 reguliert werden (Frost et al. 2012). Eine andere Analyse zeigt, dass IRE1 in *S. pombe* keinen Einfluss auf die Transkription hat,

sondern RIDD (*regulated Ire1-dependent decay*) einleitet und lediglich die mRNA des ER-Chaperons BiP nicht degradiert, sondern im Gegenteil sogar stabilisiert wird (Kimmig et al. 2012). Dauert der ER-Stress an, so aktiviert IRE1 durch Phosphorylierung eine cJun N-terminale Kinase (JNK), welche schließlich die Apoptose einleitet (Urano et al. 2000).

Wie bereits erwähnt, bindet und prozessiert IRE1 nicht nur die spezifische mRNA von Hac1/Xbp1/bZIP60, sondern auch andere nahe der ER-Membran lokalisierte mRNAs mit ähnlichen Strukturen im Bereich der Intron-Exon-Grenze und zerstört sie, um so die Last neu synthetisierter Proteine zu verringern (Hollien und Weissman 2006; Hollien et al. 2009; Hooks und Griffiths-Jones 2011; Moore und Hollien 2015) (s. Abb. 4). Dieser Prozess wird dann als RIDD bezeichnet und scheint die Aktivität von PERK zu benötigen (Moore und Hollien 2015). IRE1 kann die mRNAs nur prozessieren, sofern sie nicht translatiert werden. Eine Funktion von PERK besteht darin die Translation und damit die Proteinsynthese der meisten Proteine zu stoppen. Werden die mRNAs nicht translatiert, sind ihre Strukturen für IRE1 zu erkennen und es kann die mRNAs degradieren (Moore und Hollien 2015). Diese Interaktion ist ebenfalls wichtig für das Spleißen von Xbp1, da das Fehlen von PERK ebenfalls eine Verringerung des gespleißten Transkriptionsfaktors zur Folge hat (Moore und Hollien 2015). Diese Beobachtungen führten dazu, dass eine regulatorische Funktion von PERK im Falle von RIDD angenommen wird (Moore und Hollien 2015). Diese Regulation kann sowohl durch den Status der Translation als auch durch andere Faktoren, wie microRNAs, auf noch unbekannte Weise erfolgen (Gupta et al. 2015). RIDD wurde bislang in *Drosophila*, Mammalia und *Schizosaccharomyces pombe* nachgewiesen (Hollien und Weissman 2006; Hollien et al. 2009; Kimmig et al. 2012). Damit hat IRE1 nicht nur Einfluss auf die Transkription, sondern auch auf die Translation.

Abgesehen von der Akkumulation ungefalteter Proteine im ER-Lumen gibt es jedoch auch andere Arten von ER-Stress, welche zu einer Aktivierung von IRE1 führen können. Experimente zeigen, dass auch Stimuli, wie zum Beispiel die Lipidzusammensetzung der ER-Membran IRE1 aktivieren können (Deguil et al. 2011; Ishiwata-Kimata et al. 2013; Pineau et al. 2009; Promlek et al. 2011). Wie IRE1 diese Veränderung wahrnimmt ist jedoch noch Gegenstand weiterer Untersuchungen (Deguil et al. 2011; Pineau et al. 2009; Promlek et al. 2011). Darüber hinaus wurden unter den durch IRE1 regulierten Genen auch solche gefunden, welche dem Lipidmetabolismus und der Sekretion von Proteinen zugeordnet werden können (Kimata et al. 2006).

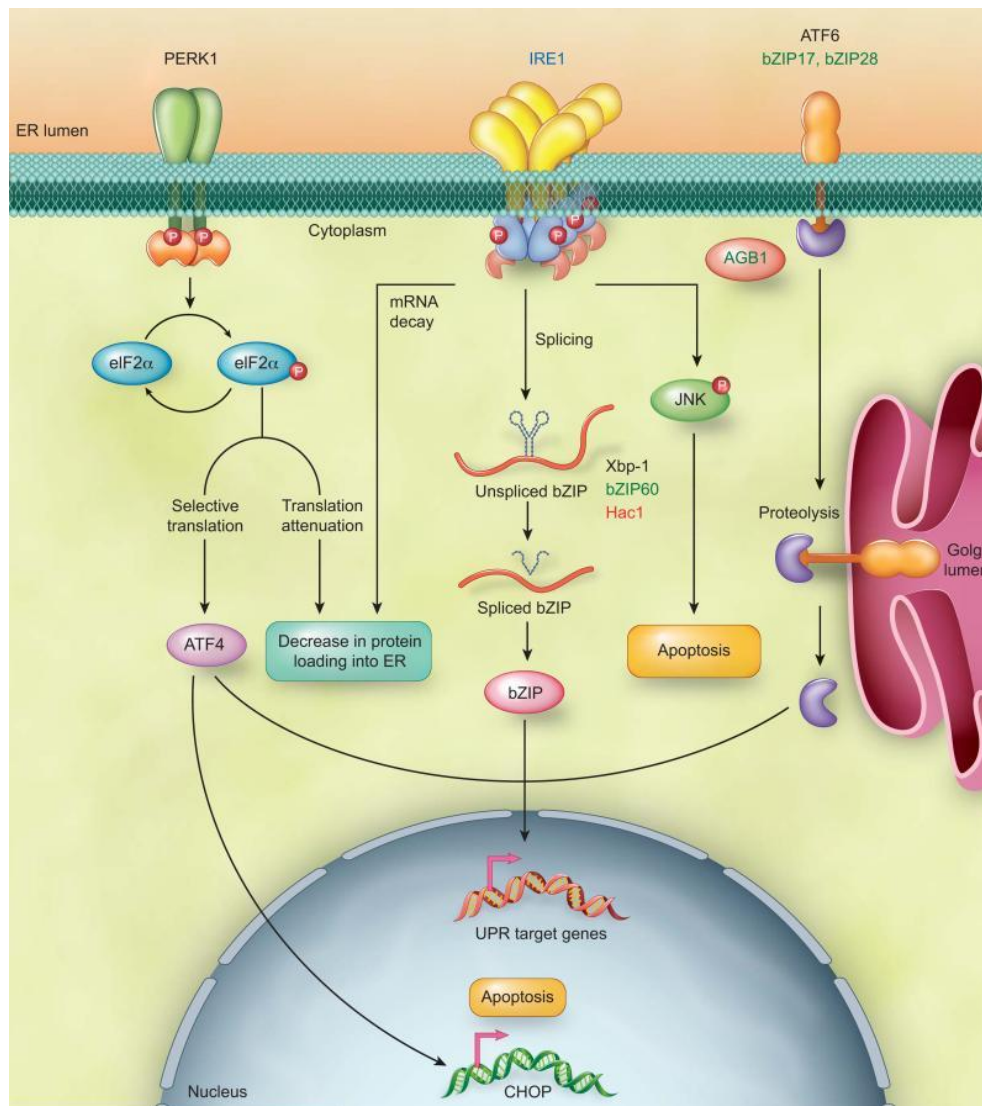


Abbildung 4: Schema der Unfolded Protein Response in Eukaryoten: ER-Stress (ungefaltete Proteine) kann durch drei membranständige Rezeptoren erkannt werden: IRE1, PERK und ATF6. IRE1 ist in den meisten untersuchten Eukaryoten konserviert. Durch ungefaltete Proteine wird die Dissoziation von BiP und IRE1 ausgelöst. Es erfolgt eine Dimerisierung, die luminalen Domänen erkennen ungefaltete Proteine und eine Autophosphorylierung sowie Oligomerisierung von IRE1 wird ausgelöst. Mit seiner cytosolischen RNase-Domäne spleißt es dann eine spezifische bZIP mRNA (Xbp1 in Metazoa, bZIP60 in Pflanzen und Hac1 in Hefe). Abgesehen von Xbp1, werden auch andere strukturell ähnliche mRNAs durch einen als RIDD (*regulated Ire1-dependent decay*) bekannten Prozess abgebaut, um weiteren Proteinimport in das ER zu verringern. Im Falle von andauerndem ER-Stress aktiviert IRE1 auch eine Kinase JNK, welche schließlich die Apoptose einleitet. ATF6 oder Proteine, welche dieselbe Funktion erfüllen, konnten in Pflanzen und Metazoa nachgewiesen werden. Nach Aktivierung wird der Rezeptor in den Golgi-Apparat transportiert. Dort wird durch zwei Proteasen der cytosolische N-Terminus frei, welcher als Transkriptionsfaktor im Kern UPR-Zielgene reguliert. PERK konnte bislang nur in den Metazoa nachgewiesen werden. Nach Aktivierung folgt eine Dimerisierung und Autophosphorylierung. Die cytosolische Kinase-Domäne phosphoryliert anschließend eIF2 α (*eukaryotic initiation factor-2 α*), was zu einem Stopp der Proteinbiosynthese führt und damit die Last durch ungefaltete Proteine im ER verringert. Gleichzeitig wird die Translation einiger spezifischer Faktoren, wie ATF4, erhöht. Dieser Transkriptionsfaktor kann bei anhaltendem Stress dann die Apoptose einleiten. Die Farbgebung einzelner Faktoren zeigt an, in welchen Organismen sie nachgewiesen wurden (blau: Eukaryoten, schwarz: Metazoa, Rot: *Saccharomyces cerevisiae*, Grün: Pflanzen) (Chen und Brandizzi 2013)

1.4.2.3 PKR-like ER Kinase (PERK)

PERK ist wie IRE1 ein ER-Membranprotein mit einer Transmembrandomäne (Harding et al. 1999). Es besitzt eine luminal Domäne, welche der Stresserkennung dient und der luminalen Domäne von IRE1 sehr ähnlich ist, sowie eine cytosolische Kinase-Domäne, welche denen anderer eIF2 α -Kinasen (*eukaryotic initiation factor-2 α*) ähnelt (Harding et al. 1999). Allerdings fehlt PERK die für IRE1 charakteristische RNase-Domäne. Im Gegensatz zu IRE1 und ATF6, welche die Proteinfaltungskapazität des ERs durch eine transkriptionelle Regulierung erhöhen, bewirkt PERK eine Reduzierung neu synthetisierter Proteine auf translationaler Ebene, sodass die Menge ungefalteter Proteine und damit der ER-Stress abnimmt (Cui et al. 2011). Aufgrund der Ähnlichkeit der luminalen Domänen erfolgt die Aktivierung von PERK ähnlich der von IRE1. Die fehlende Interaktion mit BiP führt zu einer Dimerisierung oder Oligomerisierung, die luminalen Domänen können als Dimer ungefaltete Proteine erkennen (Credle et al. 2005; Cui et al. 2011; Gardner und Walter 2011; Harding et al. 1999). Das Substrat von PERK ist eIF2 α (Harding et al. 2000b). Die Phosphorylierung von eIF2 α führt zu einer selektiven Inhibition der Translation (Cheng et al. 2005; Novoa et al. 2001). eIF2 α wird an einem Serin (Position 51) phosphoryliert und dies führt zu einer Inhibition von eIF2 β , einem Guanosintriphosphat-Austauschfaktor, durch eIF2 α (Cheng et al. 2005; Novoa et al. 2001; Teske et al. 2011). eIF2 α interagiert mit eIF2 β und bildet einen inaktiven Komplex mit gebundenem Guanosindiphosphat (Cheng et al. 2005). Dadurch bleiben auch nicht phosphorylierte eIF2 α Proteine inaktiv, da eIF2 β fehlt, um den Nukleotidaustausch zu katalysieren und die Translation wird gehemmt (Novoa et al. 2001; Novoa et al. 2003; Teske et al. 2011). Trotz der Hemmung der Translation werden einige mRNAs unter diesen Bedingungen besonders stark translatiert, wie zum Beispiel ATF4 (Harding et al. 2000a). ATF4 reguliert als Transkriptionsfaktor unter anderem auch CHOP (*CCAAT-binding homologous protein*), einen weiteren Transkriptionsfaktor, welcher die Apoptose einleiten kann (Aarti et al. 2010; Chiribau et al. 2010). Auch GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*) wird vermehrt synthetisiert (Lee et al. 2009). Im Falle von ER-Stress wird der *downstream* gelegene Leserahmen trotz eIF2 α -Phosphorylierung verstärkt translatiert und GADD34 interagiert mit der Protein Phosphatase 1, was zur Dephosphorylierung von eIF2 α und zu einer Wiederherstellung der Translation führt (Lee et al. 2009; Novoa et al. 2001). Die verstärkte Translation unter diesen Bedingungen wird durch die 5' UTR (*untranslated region*) reguliert, welche für eine maximale Expression während eines Falles von ER-Stress verantwortlich ist (Harding et al. 2000a; Lee et al. 2009). Außerdem wurde eine Verflechtung der Signalwege von PERK und ATF6 nachgewiesen. Für die Funktionalität von ATF6 wird in Mammalia ein aktives PERK benötigt (Teske et al. 2011). Möglicherweise ist der durch PERK aktivierte Transkriptionsfaktor ATF4 auch am Transport von sekretorischen Proteinen beziehungsweise dem Transport von ATF6 zum Golgi-Apparat beteiligt und bewirkt so indirekt

auch die transkriptionelle Kontrolle von UPR Zielgenen durch ATF6 (Teske et al. 2011). Zusätzlich wurden auch microRNAs entdeckt, welche durch PERK reguliert werden (Gupta et al. 2015). Diese microRNAs wiederum scheinen sowohl die Expression von ATF6 zu verringern als auch die RIDD-Aktivität von IRE1 durch andere Interaktionen zu steigern (Gupta et al. 2015). Gupta et al. kommen zu dem Schluss, dass PERK die beiden anderen Signalwege der UPR reguliert, um eine optimale Reaktion auf ER-Stress zu erreichen (Gupta et al. 2015).

Eine weitere Funktion von PERK liegt in der Inhibierung der ribosomalen RNA (rRNA) Transkription (DuRose et al. 2009). Durch die Phosphorylierung von eIF2 α wird auch die Transkription von rRNA durch die RNA Polymerase I gestoppt. Indirekt durch die Aktivität von PERK eingeleitet, kommt es zu einer Dissoziation der RNA Polymerase I, dem Transkriptionsfaktor RRN3 und dem rRNA Promotor, was zu einem Abbruch der Transkription führt (DuRose et al. 2009). Zurzeit ist dieser Prozess jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass eIF2 α nicht nur im Cytosol, sondern auch im Kern einige Funktionen erfüllt, welche durch die Phosphorylierung beeinflusst werden könnten (DuRose et al. 2009).

Außerdem konnte mit Nrf2 ein weiteres direktes Substrat von PERK identifiziert werden (Cullinan et al. 2003). Dieser Transkriptionsfaktor liegt als Heterodimer im Cytosol vor, welcher durch PERK phosphoryliert wird (Cullinan et al. 2003). Die Phosphorylierung induziert die Dissoziation des Komplexes aus KEAP1 und Nrf2, wodurch Nrf2 in den Kern importiert werden kann. Dort reguliert der Transkriptionsfaktor dann unter anderem Gene, welche daran beteiligt sind die zelluläre Redox-Homöostase zu erhalten (Cullinan et al. 2003). Dieses Signal wirkt dem pro-apoptotischen CHOP entgegen und ermöglicht es der Zelle zu überleben (Cullinan et al. 2003).

Zusätzlich zu den Funktionen die PERK während der UPR erfüllt, konnten kürzlich auch Funktionen in anderen Stress-Reaktionen unabhängig von der UPR nachgewiesen werden (van Vliet et al. 2017; Verfaillie et al. 2012).

1.4.3 Evolution der UPR in Protisten

Untersucht man die Verteilung der unterschiedlichen Rezeptoren der UPR und beachtet nur Fungi, Pflanzen und Metazoa, fällt auf, dass nur IRE1 in allen Organismen vorkommt. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass IRE1 der älteste Zweig der UPR ist und sich zu einem sehr frühen Zeitpunkt entwickelte (Hayashi et al. 2012; Hollien 2013; Mori 2009; Le Sun et al. 2013; Srivastava et al. 2013; Zhang et al. 2015). Diese Vorstellung wurde jedoch durch neuere Erkenntnisse auf die Probe gestellt. Inzwischen wurde die UPR in wesentlich mehr Organismen verschiedenster Gruppen untersucht. Es gibt einige Studien der UPR in parasitischen Protisten. Diese Experimente zeigen das Fehlen jeglicher klassischer UPR-Rezeptoren in *Giardia lamblia* oder *Entamoeba histolytica* (Santi-Rocca et al. 2012; Spycher et al. 2013). Dennoch konnte für *G. lamblia* eine transkriptionelle Reaktion auf ER-Stress gezeigt werden, obwohl IRE1 oder ATF6 Orthologe fehlen (Spycher et al. 2013). Parasiten wie *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei*, *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium falciparum* (beide Angehörige der Apicomplexa) besitzen jedoch ein Ortholog von PERK und die Phosphorylierung von eIF2 α als Folge von induziertem ER-Stress wurde nachgewiesen (Goldshmidt et al. 2010; Gosline et al. 2011; Moraes et al. 2007; Narasimhan et al. 2008). Lokalisiert wurde das Ortholog von PERK in *T. brucei* jedoch in der Membran der Flagellentasche und nicht im ER (Moraes et al. 2007). Allerdings ist diese Struktur an der Proteinsekretion beteiligt und könnte daher Änderungen, welche die Sekretion betreffen, erkennen. In diesen Organismen konnte keine transkriptionelle Reaktion bei ER-Stress beobachtet werden. Allerdings wurde in *T. brucei* gezeigt, dass einige mRNAs stark reprimiert werden, wohingegen andere stabilisiert werden, ein Prozess welcher gewisse Ähnlichkeiten zu RIDD in höheren Eukaryoten aufweist (Goldshmidt et al. 2010). Eine weitere Gemeinsamkeit liegt darin, dass *T. brucei* bei andauerndem ER-Stress die Apoptose einleitet (Goldshmidt et al. 2010). Nimmt man diese Erkenntnisse zusammen, so ist die Annahme, dass IRE1 der älteste Zweig der UPR ist fraglich. Die Tatsache, dass viele basale Eukaryoten, wie *T. brucei* oder auch *L. donovani* auf ER-Stress mit der Phosphorylierung von eIF2 α reagieren und damit die Proteinsynthese inhibieren, lässt die Vermutung zu, dass es sich hierbei um eine evolutionär ältere Reaktion handelt, welche sich vor IRE1 entwickelt hat, jedoch in bestimmten Linien, wie zum Beispiel Fungi und Pflanzen, verloren ging (Gosline et al. 2011; Hollien 2013; Moraes et al. 2007; Narasimhan et al. 2008).

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Proteom der Diatomee *P. tricornutum* mittels verschiedener Vorhersagealgorithmen auf Proteine der dritten Membran untersucht werden. Über die dritte Membran komplexer Plastiden ist noch nicht viel bekannt. Es konnte nur ein Protein der OMP85-Familie in *P. tricornutum* identifiziert werden. Ein besonderer Fokus wird auf β -barrel Proteine gelegt. β -barrel Proteine sind charakteristisch für die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien, sowie für die äußeren Membranen von Chloroplasten und Mitochondrien und werden durch eine einzigartige Struktur von anti-parallel angeordneten β -Faltblättern in der Membran verankert. Identifizierte potentielle β -barrel Proteine mit plastidären Zielsteuerungssequenzen sollen bioinformatisch analysiert werden und anschließend *in vivo* lokalisiert und deren Membranintegration durch Carbonatextraktion überprüft werden.

In einem zweiten Teil des Projekts wird auf frühere Beobachtungen zurückgegriffen. Es wurden mehrere Proteine im ER lokalisiert, die jedoch unterschiedliche Fluoreszenzmuster aufwiesen. So besteht Grund zu der Annahme, dass das ER der Diatomee in ein sogenanntes *hostER* und das bereits beschriebene *cER* aufgeteilt ist. Studien zeigen eine erhöhte Konzentration von Transporterproteinen im *cER* im Vergleich zum *hER*. Das *cER* besitzt somit mehr Faktoren für den Transport von Proteinen und Metaboliten als das *hER*. Außerdem legt die Physiologie einer pflanzlichen Zelle nahe, dass während der Lichtstunden eine größere Anzahl von ungefalteten Proteinen durch das *cER* in die Plastide transportiert werden müssen, als dies für das *hER* zu erwarten ist. Eine Aufgabenteilung von *hER* und *cER* könnte sich demnach auch auf die Proteinfaltung und Proteinqualitätskontrollen auswirken. Es wird angenommen, dass das *cER* nur verringerte Proteinfaltungskapazitäten im Vergleich zum *hER* aufweist. Aus diesem Grund soll eine funktionelle Sub-Kompartimentierung des ERs am Beispiel der Faktoren der *Unfolded Protein Response* (UPR) untersucht werden. Mittels Lokalisationsstudien und einem Vergleich mit anderen ER-residenten Membranproteinen soll die Verteilung der UPR im ER der Diatomee *P. tricornutum* analysiert werden.

3. Ergebnisse

3.1 Vorhersage und Lokalisation von Proteinen der äußeren Chloroplastenmembran

Um mehr über die dritte Membran zu erfahren, wurde in dieser Arbeit eine Analyse auf plastidäre β -barrel Proteine durchgeführt. Aufgrund der vermuteten Homologie der dritten Membran komplexer Plastiden und äußerer Chloroplastenmembran primärer Plastiden wird angenommen, dass es innerhalb der dritten Membran Proteine gibt, welche über ein β -barrel in der Membran verankert sind, eine Eigenschaft, welche sie von allen anderen Membranproteinen innerhalb der komplexen Plastide unterscheidet. β -barrel Proteine konnten bislang in Eukaryoten nur in Membranen nachgewiesen werden, welche einen endosymbiontischen Ursprung haben. Diese Proteine sind charakteristisch für die äußere Membran Gram-negativer Bakterien sowie für die äußeren Membranen von Chloroplasten und Mitochondrien (Kim et al. 2007). Es wurden verschiedene Ansätze gewählt. Mittels BLAST-Analysen wurden bereits identifizierte Proteine der äußeren Chloroplastenmembran im Genom und Proteom von *P. tricornutum* gesucht. Dabei wurde unter anderem auf Daten von Simm et al. zurückgegriffen (Simm et al. 2013). Es wurden jedoch keine entsprechenden Homologe gefunden. In einem zweiten Ansatz wurde ein Datensatz von als sehr wahrscheinlich plastidär vorhergesagten Proteinen auf β -barrel Proteine hin untersucht (Gruber et al. 2015). In dieser Analyse wurden die Vorhersagealgorithmen TMBETA-DISC, Pred-TMBB, BOMP und MCMBB angewandt (Bagos et al. 2004a; Bagos et al. 2004b; Berven et al. 2004; Ou et al. 2008). Proteine, die von mehr als einem Algorithmus als β -barrel Protein eingestuft wurden, wurden auf das Vorhandensein von α -Helices und ihre Funktion hin durch eine BLAST-Analyse untersucht. Proteine ohne Funktion wurden in dieser Analyse nicht weiter berücksichtigt. Die vorhergesagten Funktionen der anderen Proteine sprachen gegen eine Lokalisation in der äußeren Chloroplastenmembran (s. Anhang 8.1). Daher wurde in einem dritten Ansatz eine Analyse des gesamten Proteoms von *P. tricornutum* auf β -barrel Proteine durchgeführt.

3.1.1 *In silico* Vorhersage von potentiellen plastidären β -barrel Proteinen aus dem Proteom von *Phaeodactylum tricornutum*

Um potentielle β -barrel Proteine mit plastidären Zielsteuerungssequenzen zu identifizieren, wurden zunächst verschiedene Algorithmen mit der Sequenz des bereits bekannten ptOMP85 getestet (Bullmann et al. 2010). Aufgrund seiner umfangreichen Parameter wurde daraufhin PSORTb 3.0 ausgewählt, da es auch eine Vorhersage von α -Helices in die Analyse mit einbezieht (Yu et al. 2010). Ein Datensatz, der alle vorhergesagten Proteine der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* enthielt, war der Ausgangspunkt dieser Analyse (PhaeoDB v2.0). Es wurden sämtliche Proteine, die durch PSORTb 3.0 mit den Parametern Gram-negatives Bakterium mit äußerer Membran als "Outer Membrane" (OM) eingeteilt wurden, einer Analyse auf N-terminale Zielsteuerungssequenzen unterzogen, da plastidäre Proteine in Organismen mit komplexen Plastiden eine BTS benötigen, um über die beiden äußeren Membranen transportiert zu werden (Stork et al. 2012). Wie in Tabelle 1 dargestellt, wurden durch den Algorithmus von 56472 Proteinen 295 als OM vorhergesagt. Diese wurden anschließend einer genaueren Überprüfung unterzogen und die Modelle soweit als möglich auf eine korrekte Vorhersage und das Vorhandensein eines Signalpeptids mit SignalP 3.0 und 4.1 und TargetP 1.1 (*non-plant network*) sowie auf deren putative Funktion durch BLAST-Analysen hin untersucht (Emanuelsson et al. 2000; Bendtsen et al. 2004; Petersen et al. 2011).

Tabelle 1: Ergebnisse der Analyse des Proteoms durch PSORTb 3.0

Vorhersage PSORTb 3.0	Anzahl der Proteine	Anteil in %
Gesamt	56472	
Cytoplasmatisch	2198	46,40
Cytoplasmamembran (CM)	9574	16,95
Extrazellulär (E)	1203	2,13
<i>Outer Membrane</i> (OM)	295	0,52
Periplasmatisch	679	1,20
Unbekannt (U)	18523	32,80

Nach der Analyse dieser 295 Proteinmodelle konnte die Gesamtzahl korrekter Modelle auf 137 reduziert werden. Von diesen 137 vorhergesagten Proteinmodellen wurde nur für 25 ein Signalpeptid vorhergesagt (siehe Anhang 8.2). Diese wurden danach mit weiteren Vorhersagealgorithmen für β -barrel Proteine analysiert (Bagos et al. 2004a; Bagos et al. 2004b; Berven et al. 2004; Hayat et al. 2016; Ou et al. 2008; Tsirigos et al. 2016; Yu et al. 2010). BOCTOPUS2 wurde dazu genutzt die potentiellen Transmembrandomänen der β -barrel Proteine zu identifizieren, da es nicht für die Vorhersage von β -barrel Proteinen, sondern von deren Topologie entwickelt wurde (Hayat et al. 2016). Eine Vorhersage als OM durch PSORTb war bereits ausreichend, um die Kandidaten als mögliche β -barrel Proteine beziehungsweise Proteine der äußeren Chloroplastenmembran einzustufen.

3. Ergebnisse

Tabelle 2: In silico Analyse putativer β -barrel Proteine mit verschiedenen Algorithmen: Mit TargetP1.1 wurden die Vorhersagen mit der Vorgabe "non-plant network" durchgeführt. M = Mitochondriale Zielsteuerungssequenz, S = Signalpeptid, - = keine vorhergesagte Zielsteuerungssequenz. Zahlen in Klammern geben den durch den Algorithmus ausgegebenen Wert an, "+" oder "-" geben an, ob die Vorhersage positiv oder negativ ausfiel. TM = Transmembrandomäne (β -Strang). a = Das entsprechende Proteinmodell konnte weder von gDNA noch von cDNA amplifiziert werden. b = Das Proteinmodell wurde nach Amplifikation als falsch bestätigt und die Vorhersagen als β -barrel Protein fielen negativ aus. c = Das Proteinmodell wurde nach Amplifikation durch PCR korrigiert, das Protein wurde anschließend dennoch als β -barrel Protein charakterisiert. d = Das Protein wurde durch eine BLAST-Analyse identifiziert und das Modell durch EST-Daten korrigiert und anschließend als β -barrel Protein positiv identifiziert. Außerdem diente es als interne Kontrolle. e = Das Protein wurde durch BLAST-Analyse identifiziert, als β -barrel Protein charakterisiert und diente ebenfalls als interne Kontrolle. Wie in Tabelle 1 ersichtlich, wurden die Vorhersagen durch PSORTb als OM (*Outer Membrane*), CM (Cytoplasmamembran), E (Extrazellulär) und U (Unbekannt) abgekürzt.

ID	SignalP	TargetP 1.1	BOMP	MCMBB (Score)	TMBETADISC	BOCTOPUS2	Pred-TMBB2	Pred-TMBB (Score)	TOPCONS (α -Helix)	PSORTb (Score)	PSORTb (korrigiert)	BLAST
23673	+	M	-	- (-0.004)	+	-	- (0.004)	+ (2.876, 2 TM)	+	OM (8,97)		-
30562	+	S	-	- (-0.016)	+	-	- (0.134)	- (2.985)	-	OM (9,49)		<i>Co²⁺/Mg²⁺ efflux protein</i> ApaG
33675 ^c	+	S	-	+ (0.041)	-	-	- (0.066)	+ (2.939, 2 TM)	-	E (9,64)	E (6,26), OM (3,23)	-
33911	+	S	-	- (-0.053)	+	-	+ (0.771)	- (3.008)	+	OM (9,49)		-
34389	+	M	-	- (-0.025)	+	-	- (0.215)	- (3.062)	-	OM (9,49)		-
35438 ^b	+	S	-	- (-0.0032)	+	-	- (0.000)	-(3.000)	-	OM (9,49)	CM (9,82)	<i>L-domain like protein</i>
35593	+	M	-	- (-0.004)	+	-	- (0.005)	+ (2.881, 2 TM)	+	OM (9,52)		-
37910	+	S	-	- (-0.003)	+	-	- (0.006)	+ (2.942, 2 TM)	-	OM (9,49)		-
38354 ^c	+	S	-	- (-0.005)	+	-	- (0.000)	+ (2.889, 2 TM)	-	OM (9,49)	OM (9,52)	S8 Peptidase
38818	+	S	-	- (-0.004)	+	-	- (0.005)	- (3.016)	-	OM (9,49)		-
39964 ^a	+	S	-	- (-0.006)	+	-	+ (0.972)	+ (2.964, 10 TM)	-	OM (9,52)		-
40309 ^c	+	S	-	- (-0.061)	-	-	- (0.004)	+ (2.948, 2 TM)	-	OM (9,49)	U	<i>Frustulin-like protein</i>
41024	+	S	-	- (-0.013)	+	-	- (0.197)	- (3.016)	-	OM (9,49)		-
41302	+	S	-	- (-0.001)	+	-	- (0.003)	+ (2.952, 2 TM)	-	OM (9,49)		-

3. Ergebnisse

41623	+	S	-	- (-0.051)	-	-	- (0.004)	- (2.999)	-	OM (8,28)		<i>FKBP-like protein</i>
42510	+	-	-	- (-0.015)	+	-	+ (0.478)	+ (2.937, 2 TM)	-	E (9,64)		-
43598	+	M	-	- (-0.01)	+	-	- (0.000)	- (3.010)	-	OM (9,52)		-
43805 ^a	+	S	-	- (-0.028)	-	-	- (0.000)	- (2.991)	-	OM (9,49)		-
44488	+	S	-	- (-0.001)	-	-	- (0.072)	+ (2.875, 8 TM)	-	E (9,44)		-
44924	+	S	-	- (-0.021)	+	-	- (0.001)	- (3.006)	-	OM (9,52)		-
45678	+	M	-	- (-0.018)	+	-	- (0.012)	- (3.040)	+	OM (9,49)		-
45803	+	S	-	- (-0.011)	+	-	+ (0.590)	- (3.016)	-	OM (9,52)		-
46203	+	M	-	- (-0.037)	+	-	- (0.000)	- (3.026)	-	E (9,64)		-
48025	+	S	-	+ (0.009)	+	-	- (0.052)	- (2.987)	-	OM (9,49)		<i>DnaJ heat shock protein</i>
48890	+	S	-	- (-0.033)	+	-	- (0.026)	- (2.986)	-	OM (9,49)		-
48902	+	M	-	+ (0.000)	+	-	- (0.009)	- (2.980)	-	E (9,64)		-
49618 ^a	+	M	-	+ (0.006)	+	-	- (0.009)	+ (2.918, 2 TM)	-	OM (8,97)		-
49699	+	S	-	- (-0.028)	+	-	- (0.002)	- (3.030)	-	E (9,65)		-
49869	+	-	-	- (-0.031)	+	-	- (0.008)	- (2.984)	-	E (9,64)		-
49931 ^c	+	M	-	- (-0.031)	+	-	- (0.008)	- (3.036)	+	OM (9,52)	OM (9,52)	-
39419 ^d	-	-	+	+ (0.007)	+	-	+ (1.000)	+ (2.941, 14 TM)	-	U (5,48)	OM (9,49)	<i>Sorting and Assembly Machinery 50/ Sam50</i>
46881	+	S	-	- (-0.004)	+	14 TM	+ (0.704)	- (2.985)	-	OM (9,49)		ptOMP85
48010 ^e	+	M	-	- (-0.021)	-	8 TM	+ (1.000)	+ (2.932, 2 TM)	-	E (9,65)		<i>Mitochondrial Translocase Subunit/ Tom40</i>

Ursprünglich wurde noch ein weiterer Algorithmus (TMBETA-net) benutzt, der jedoch im späteren Verlauf der Analyse nicht mehr nutzbar war, und nur ein Teil der Kandidaten mit diesem Algorithmus untersucht werden konnte (Gromiha et al. 2005). Daher wurden diese Vorhersagen aus der Übersicht in Tabelle 2 entfernt (siehe Anhang 8.3). Nachdem keine Kandidaten für die mitochondrialen β -barrel Proteine Sam50 und Tom40 in diesem Datensatz identifiziert werden konnten, wurde die Suche anschließend noch erweitert. Es wurden Homologe dieser beiden Proteine durch eine BLAST-Analyse identifiziert. Mit den Sequenzen der beiden Proteine Sam50 und Tom40 von *Saccharomyces cerevisiae* wurden zunächst Homologe in Rhodophyten beziehungsweise Heterokontophyten identifiziert und dadurch schließlich auch putative Homologe in *P. tricornutum*. Ein putatives Tom40-Homolog (48010) mit vorhergesagtem Signalpeptid wurde durch PSORTb als extrazellulär vorhergesagt. Nachdem jedoch bereits eine einfache BLAST-Analyse eine hohe Wahrscheinlichkeit ergab, dass es sich hier um ein β -barrel Protein handelt, wurden auch sämtliche Proteinmodelle, welche als extrazellulär vorhergesagt wurden in die Analyse mit einbezogen. PSORTb sagte 1203 Proteine als extrazellulär vorher. Diese wurden anschließend zunächst auf das Vorhandensein eines Signalpeptids und mit dem Algorithmus TOPCONS auf potentielle α -helicale Transmembrandomänen untersucht (Tsirigos et al. 2015). Es wurden 85 Proteine mit Signalpeptid und davon 75 ohne α -helicale Transmembrandomäne ermittelt. Proteine ohne vorhergesagte α -Helices wurden wiederum mittels BLAST-Analyse auf eine putative Funktion hin analysiert. Sämtliche Kandidaten, für welche mit BLAST eine mögliche Funktion ermittelt werden konnte, wurden ausgeschlossen. Ebenso wurden alle Kandidaten ausgeschlossen, die keine Homologe in anderen Organismen mit roten komplexen Plastiden aufwiesen. Anschließend wurden die verbliebenen Proteine mit den bereits zuvor genutzten Vorhersagealgorithmen für β -barrel Proteine analysiert und dann als positiv eingestuft, wenn zumindest ein Algorithmus sie als β -barrel Protein charakterisierte. Durch diesen Ansatz wurden 8 weitere Kandidaten der Liste hinzugefügt. Darüber hinaus wurde auch ein potentiell SAM50-Homolog identifiziert. Das in der Datenbank hinterlegte Proteinmodell (39419) war jedoch nicht vollständig und enthielt falsche Introns. Ein großer Teil des C-Terminus fehlte. Nachdem das Modell manuell korrigiert wurde, wurde es mit den in Tabelle 2 aufgelisteten Algorithmen analysiert und von mehreren als β -barrel Protein eingestuft, unter anderem auch durch PSORTb. Anschließend wurden die ausgewählten Proteine C-terminal mit eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) fusioniert und *in vivo* lokalisiert.

3.1.2 *In vivo* Lokalisation putativer plastidärer β -barrel Proteine

Die zuvor durch bioinformatische Analysen als β -barrel Proteine vorhergesagten Kandidaten wurden in voller Länge amplifiziert und C-terminal mit eGFP fusioniert und unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors in *P. tricornutum* transfiziert. Es wurden insgesamt 33 Kandidaten durch die *in silico* Vorhersagen ermittelt, die bis auf eine Ausnahme, ein Signalpeptid aufweisen. Bei drei Kandidaten handelte es sich jedoch entweder um Kandidaten für die äußere mitochondriale Membran (34419/Sam50-like, 48010/Tom40-like) oder das bereits identifizierte ptOMP85, welche als Kontrolle der Vorhersagen dienten. Von den also letztendlich 30 putativen plastidären β -barrel Proteinen konnten 23 lokalisiert und vier Modelle, sowie die daraus resultierenden Vorhersagen, als fehlerhaft oder nicht amplifizierbar identifiziert werden (35438, 39964, 43805, 49618). Die gezeigten Fluoreszenzbilder wurden mit der Software ImageJ bearbeitet.

3.1.2.1 *In vivo* Lokalisationen in der Plasmamembran

Mehrere Proteine (33911, 35593, 41302 und 49931) konnten daraufhin in der Plasmamembran lokalisiert werden (s. Abb. 5A). Für 33911, 35593 und 49931 konnten α -helicale Transmembrandomänen durch TOPCONS ermittelt werden (s. Tabelle 2). Alle vier Proteine wurden durch TMBETADISC und PSORTb als β -barrel Proteine, beziehungsweise Komponenten der äußeren Membran vorhergesagt (Ou et al. 2008; Yu et al. 2010). Darüber hinaus wurden 33911 (Pred-TMBB2), 35593 (Pred-TMBB) und 41302 (Pred-TMBB) jeweils durch einen weiteren Algorithmus als β -barrel Proteine vorhergesagt (Bagos et al. 2004b; Tsirigos et al. 2016). Für 33911 konnte auch eine Vorhersage mit TMBETA-net durchgeführt werden, welche es ebenfalls als β -barrel Protein charakterisierte. Für das Protein 33911 wurde auch eine Carbonatextraktion durchgeführt, um die Membranintegration zu überprüfen. Wie in Abbildung 5B zu sehen, zeigte die Detektion des Proteins durch einen GFP-Antikörper, dass es ein integrales Membranprotein ist. Es wurde ein Signal bei der erwarteten Größe von etwa 68 kDa in der löslichen und integralen Fraktion beobachtet. Die Kontrollen zeigten eine saubere Trennung der Fraktionen an. Es wurden, sofern nicht anders vermerkt, immer 5 μ g der integralen Membranfraktion und dasselbe Volumen der assoziierten und löslichen Fraktion für die Detektion des Fusionsproteins mit dem eGFP-Antikörper (1:3.000) aufgetragen. Für die Kontrollen wurden nur 2,5 μ g der integralen Fraktion eingesetzt. Als löslicher Marker diente RbcL (α -RbcL, 1:7.500) und als Marker für die Membranfraktion psbD (α -psbD, 1:7.500). Die Induktionsdauer betrug 8 bis 24 Stunden.

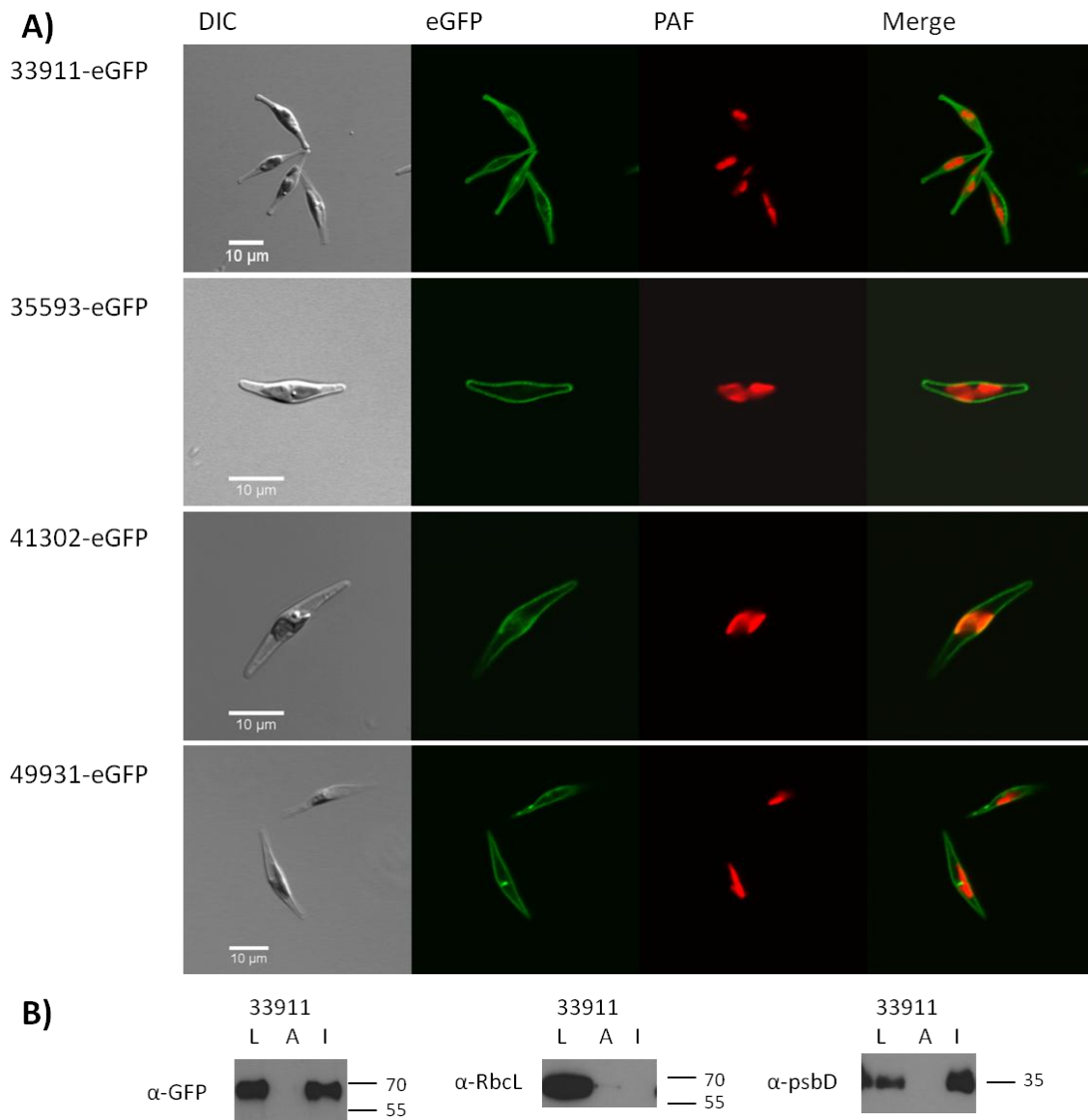


Abbildung 5: *In vivo* Lokalisationen von eGFP-Fusionsproteinen in der Plasmamembran und Carbonatextraktion von 33911: A) Die Abbildung zeigt die Lokalisation der Fusionsproteine 33911, 35593, 41302 und 49931 mit einem C-terminalen eGFP. Alle vier Proteine zeigen die charakteristische Fluoreszenz von Proteinen, welche in der Plasmamembran lokalisiert sind. Die Fluoreszenz umrandet die Zelle ohne jedoch größere andere Strukturen in der Zelle anzufärben. Für 33911, 35593 und 49931 konnten potentielle α -helicale Transmembrandomänen vorhergesagt werden. DIC: *differential interference contrast*, PAF: Plastidenautofluoreszenz, Merge: Überlagerung von eGFP und PAF Kanal. B) Hier wurde die Membranintegration des Proteins 33911 durch Carbonatextraktion überprüft. Das Protein hat eine vorhergesagte Masse von etwa 68 kDa. Es konnte in der löslichen (L) und integralen (I) Fraktion, nicht jedoch in der assoziierten Fraktion (A) auf Höhe der erwarteten Größe nachgewiesen werden. Die Kontrollen mit dem löslichen Markerprotein RbcL (55 kDa) und dem integralen Markerprotein psbD (35 kDa) zeigen eine erfolgreiche Fraktionierung an.

3.1.2.2 *In vivo* Lokalisationen im Cytosol

Lokalisationsstudien von 37910, 38354, 44924 und 48902 zeigten eine Fluoreszenz im Cytosol (s. Abb. 6). Dabei wurden 37910, 38354 und 44924 jeweils durch PSORTb und TMBETADISC als β -*barrel* Proteine vorhergesagt. Zusätzlich dazu wurden 37910 und 44924 auch durch TMBETA-net positiv getestet. 37910 und 38354 wurden ebenfalls durch Pred-TMBB als β -*barrel* Proteine charakterisiert. 48902 ist Teil des erweiterten Datensatzes und wurde ursprünglich durch PSORTb als extrazelluläres Protein vorhergesagt. Aufgrund der positiven Analyse durch MCMBB wurde es als putatives β -*barrel* Protein eingestuft (Bagos et al. 2004a). Alle vier Proteine scheinen keine α -helicalen Transmembrandomänen zu enthalten, was eine Analyse mit TOPCONS zeigte.

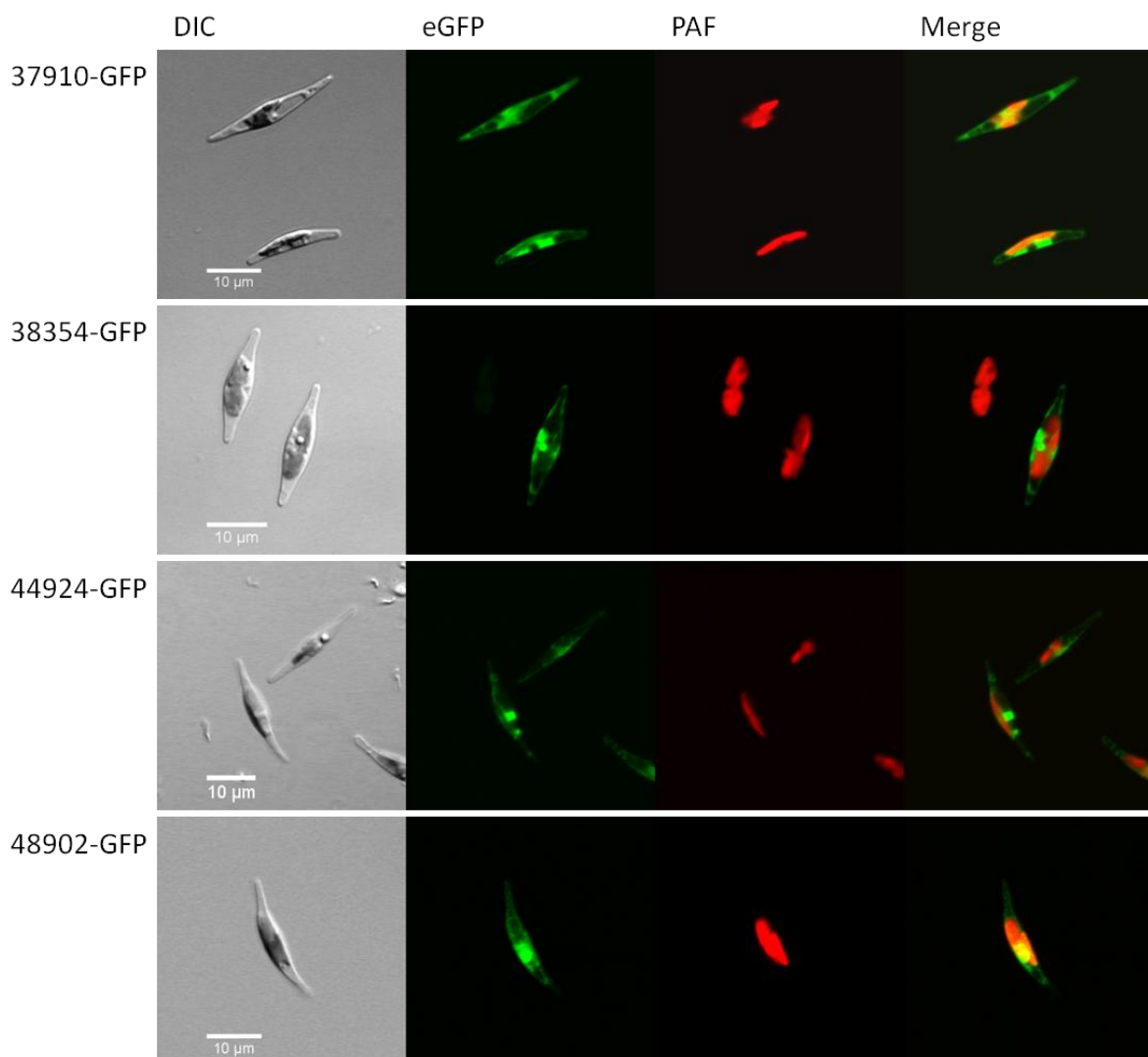


Abbildung 6: *In vivo* Lokalisationen der Proteine 37910, 38354, 44924, 48902: Die Abbildung zeigt die Lokalisation der Fusionsproteine 37910, 38354, 44924, 48902 mit einem C-terminal fusionierten eGFP. Alle vier Proteine zeigen ein cytosolisches Fluoreszenzmuster. DIC: *differential interference contrast*, PAF: *Plastidenautofluoreszenz*, Merge: Überlagerung des eGFP und PAF Kanals.

3.1.2.3 *In vivo* Lokalisationen in diversen Kompartimenten

Die Proteine 34389, 41024, 42510, 45803 und 49869 wurden alle durch den Algorithmus TMBETADISC als β -*barrel* Proteine vorhergesagt. Darüber hinaus wurden 34389, 41024 und 45803 zuvor durch PSORTb als OM eingestuft. Darüber hinaus liegen positive Analysen für 45803 durch die Algorithmen Pred-TMBB2 und TMBETA-net vor. Die beiden Proteine 42510 und 49869 stammen aus dem erweiterten Datensatz und wurden ursprünglich als extrazellulär durch PSORTb vorhergesagt. 42510 wurde zudem durch die Algorithmen Pred-TMBB und Pred-TMBB2 als β -*barrel* charakterisiert. Eine Analyse durch TOPCONS zeigte keine vorhergesagten α -helicalen Transmembrandomänen. Die Fusionskonstrukte zeigten unterschiedliche Fluoreszenzen außerhalb der Plastide.

Das Protein 34389 zeigt eine fadenförmige Struktur in unmittelbarer Nähe der Plastide. Teilweise umrandet die Fluoreszenz die Autofluoreszenz, geht aber auch deutlich darüber hinaus. Die Fluoreszenz liegt also klar außerhalb der Plastide. Zusätzlich zu einem Signalpeptid wurde für 34389 auch eine mitochondriale Zielsteuerungssequenz vorhergesagt. Dieses Fluoreszenzmuster deutet auf eine mögliche Lokalisation im Mitochondrium hin. Eine Carbonatextraktion konnte nachweisen, dass es sich bei 34389 um ein Membranprotein handelt (s. Abb. 7 und 8 C). Die Kontrollen der Fraktionierung zeigten eine erfolgreiche Trennung der Fraktionen an. Ein Kolokalisation mit einem Marker für Mitochondrien (MitoTracker® Orange CMTMRos, ThermoScientific) blieb ohne Ergebnisse.

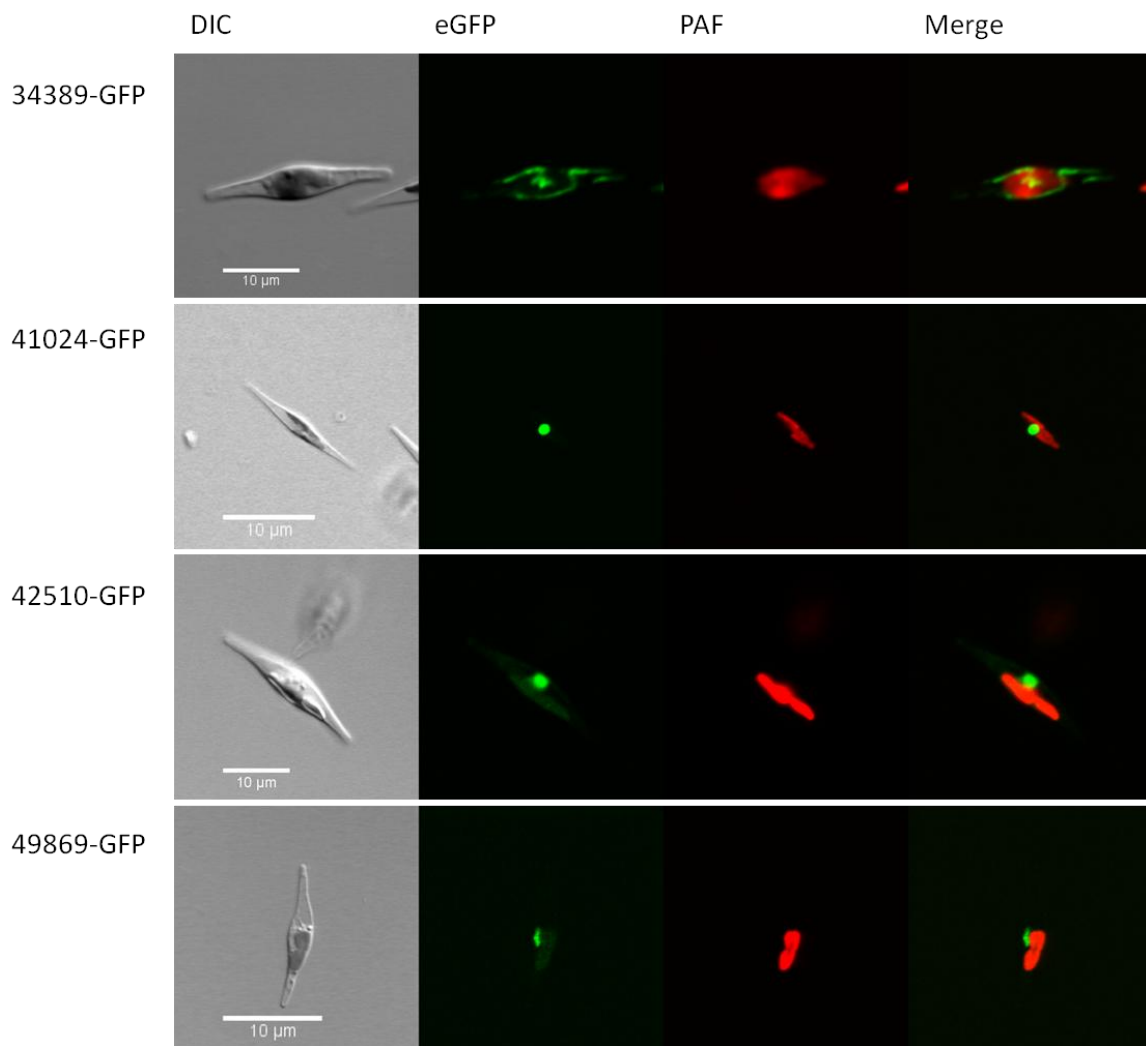


Abbildung 7: In vivo Lokalisation der Proteine 34389, 41024, 42510 und 49869: Es handelt sich um C-terminal mit eGFP fusionierte Konstrukte. Die Fluoreszenz des Proteins 34389 zeigt eine fadenförmige Struktur in unmittelbarer Nähe zur Plastide, jedoch klar außerhalb der Plastide lokalisiert. Es handelt sich möglicherweise um eine Lokalisation im Mitochondrium, jedoch sind weitere Analysen notwendig. Die Proteine 41024 und 42510 zeigen eine kreisrunde Fluoreszenz seitlich der Plastide. Es handelt sich um ein Fluoreszenzmuster nukleärer Proteine. 49869 zeigt eine sichelförmige Fluoreszenz am äußeren Rand der Plastide. Diese Fluoreszenz kann dem Golgi-Apparat zugeordnet werden. DIC: *differential interference contrast*, PAF: Plastidenautofluoreszenz, Merge: Überlagerung von eGFP und PAF Kanal.

41024 und 42510 zeigten kreisrunde Fluoreszenzmuster unmittelbar neben der Plastide (s. Abb. 7). 49869 zeigt ebenfalls eine Fluoreszenz seitlich der Plastide, jedoch zeigt sich hier keine runde Struktur, sondern eher ein sichelförmiges Muster am äußeren Rand der Plastide, eine Fluoreszenz wie sie im Golgi-Apparat beobachtet werden kann. Das Fluoreszenzmuster der Proteine 41024 und 42510 ist dem von 45803 äußerst ähnlich (s. Abb. 8A). Mittels einer DAPI-Färbung der Nukleinsäuren konnte für 45803 eine nukleäre Lokalisation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Ähnlichkeit der beobachteten Fluoreszenz kann für 41024 und 42510 ebenfalls eine nukleäre Lokalisation angenommen werden. Zudem wurde für 45803 eine Carbonatextraktion durchgeführt, um die Membranintegration zu überprüfen. Es wurde nur ein

Signal in der löslichen Fraktion detektiert, wobei die Kontrollen eine erfolgreiche Fraktionierung anzeigen (s. Abb. 8 B). Es sind weitere Analysen notwendig, um die Lokalisationen zu bestätigen.

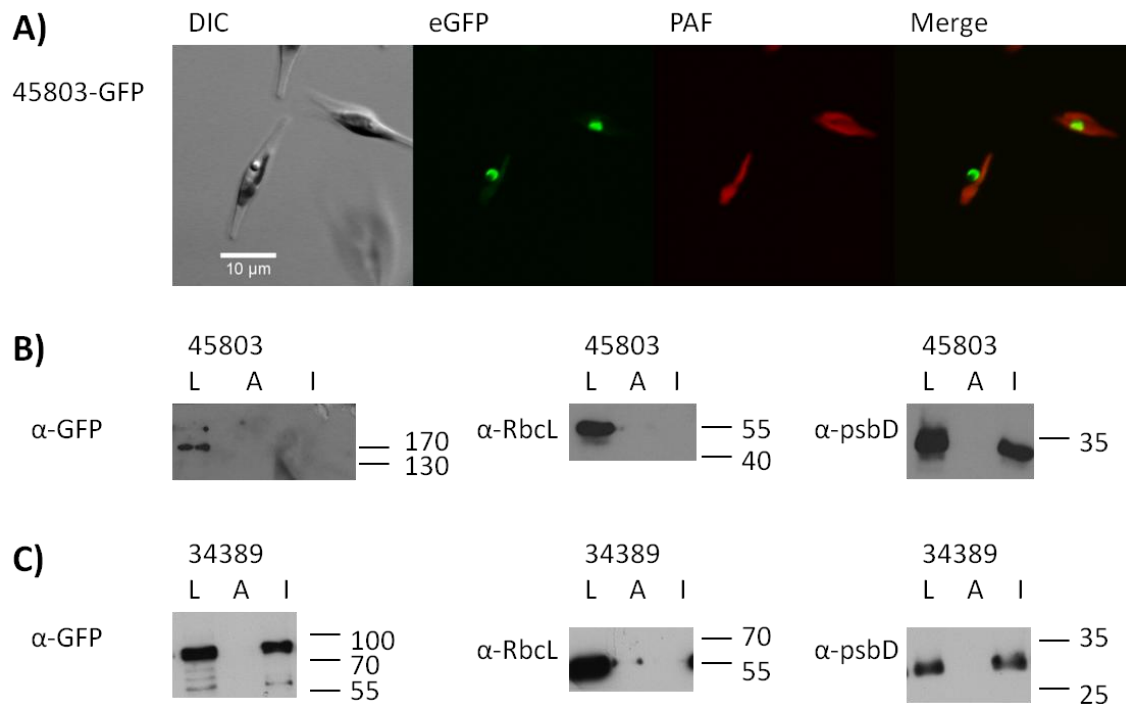


Abbildung 8: *In vivo* Lokalisation von 45803 und Carbonatextraktion der Proteine 45803 und 34389: A) Die Abbildung zeigt die Lokalisation des Fusionsproteins 45803 mit C-terminalem eGFP. Die Fluoreszenz zeigt eine klassische Lokalisation im Zellkern. DIC: *differential interference contrast*, PAF: Plastidenautofluoreszenz, Merge: Überlagerung von eGFP und PAF Kanal. B) Die Carbonatextraktion zeigt, dass 45803 mit einer erwarteten Größe von ungefähr 180 kDa nur in der löslichen Fraktion (L) detektiert wird. Die Kontrollen des löslichen Markers RbcL und des integralen Membranproteins psbD zeigen die erwarteten Signale bei 55 kDa bzw. 35 kDa. C) Die Carbonatextraktion von 34389 zeigt, dass das Protein mit einer erwarteten Größe von etwa 75 kDa bei einer Größe von 70 bis 100 kDa sowohl in der löslichen und der integralen Fraktion (I) detektiert wird. Außerdem sind weitere Signale zu detektieren, welche auf Degradationsprodukte zurückzuführen sind. Die Kontrollen zeigen auch in diesem Fall eine erfolgreiche Fraktionierung. Es handelt sich bei 34389 um ein Membranprotein.

3.1.2.4 *In vivo* Lokalisationen im endoplasmatischen Retikulum

Die Proteine 38818, 40309, 41623 und 44488 zeigen ein Fluoreszenzmuster, wie es für ER-Membranproteine typisch ist (s. Abb. 9). 45678 zeigt ebenfalls eine ER-Lokalisation, jedoch ist die Fluoreszenz hier sehr stark in der Kernhülle und etwas schwächer um die Plastide im cER konzentriert, wohingegen die anderen Proteine dieses Muster nicht aufweisen (s. Abb. 10A). Zunächst wurden die vier Proteine 38818, 40309, 41623 und 45678 durch PSORTb als *β-barrel* Proteine vorhergesagt. Nach einer Überprüfung durch PCR konnte jedoch festgestellt werden, dass das Genmodell von 40309 nicht demjenigen in der Datenbank entsprach. Nach erneuter Überprüfung durch die Vorhersagealgorithmen mit der korrigierten Aminosäuresequenz wurde 40309 durch PSORTb als Unbekannt charakterisiert, jedoch sagte Pred-TMBB das Protein als *β-barrel* vorher, sodass es dennoch analysiert wurde. Um den Proteinen eine mögliche Funktion zuzuordnen, wurde eine BLAST-Analyse durchgeführt, welche für 40309 Ähnlichkeiten zu Frustulinen vorhersagte. Dies sind Proteine der Zellwand von Diatomeen. Außerdem wurde für das Protein 41623 eine Funktion als *FKBP-like protein* vorhergesagt, welche unter anderem als Chaperone am Proteintransport beteiligt sind (s. Tabelle 2).

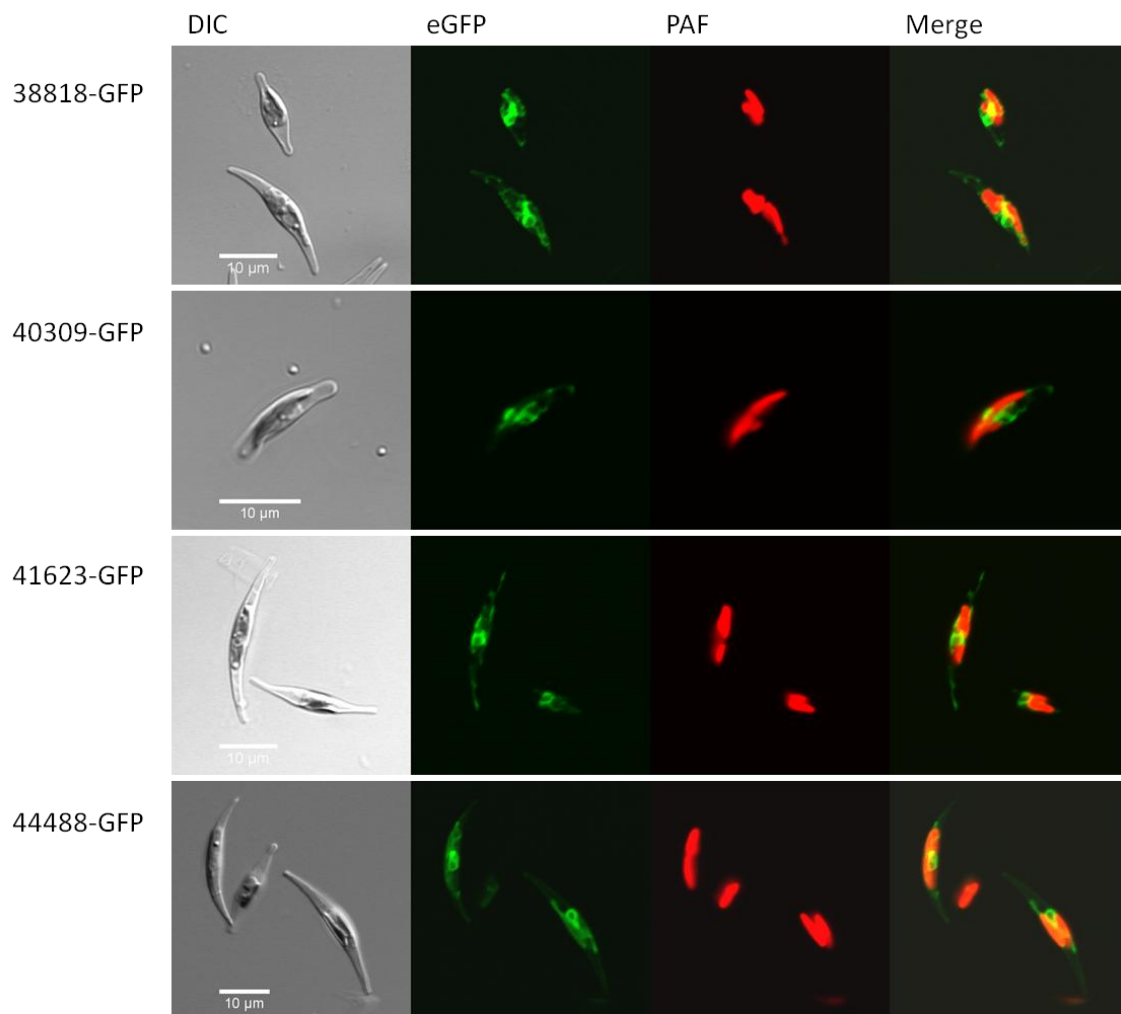


Abbildung 9: *In vivo* Lokalisationen der Proteine 38818, 40309, 41623 und 44488 im endoplasmatischen Retikulum: Die Abbildung zeigt die Lokalisationen der Proteine 38818, 40309, 41623 und 44488, welche mit einem C-terminalen eGFP fusioniert wurden. Bei allen vier Proteinen zeigt sich eine Fluoreszenz typisch für ER-Membranproteine. Alle färben eine runde Struktur an, welche der Kernhülle entspricht, sowie die äußerste Plastidenmembran (cER) und einige Bereiche des endoplasmatischen Retikulums, die abseits der Plastide im Cytosol liegen. DIC: *differential interference contrast*, PAF: Plastidenautofluoreszenz, Merge: Überlagerung des eGFP und PAF Kanals.

Sowohl 38818 als auch 45678 wurden ebenfalls durch TMBETADISC und 45678 zusätzlich durch TMBETA-net als β -barrel Protein vorhergesagt. Jedoch zeigte eine spätere Analyse mit TOPCONS auch eine vorhergesagte α -helicale Transmembrandomäne für 45678 an, was durch eine Carbonatextraktion bestätigt werden konnte (s. Abb. 10B). Das Signal für 45678-GFP (etwa 70 kDa) wurde sowohl in der löslichen als auch der integralen Fraktion detektiert, wobei die Kontrollen anzeigen, dass die Zellfraktionierung erfolgreich war. 44488 stammt aus dem erweiterten Datensatz und wurde durch PSORTb als extrazellulär vorhergesagt. Eine Analyse mit Pred-TMBB charakterisierte das Protein als β -barrel Protein mit acht Transmembrandomänen.

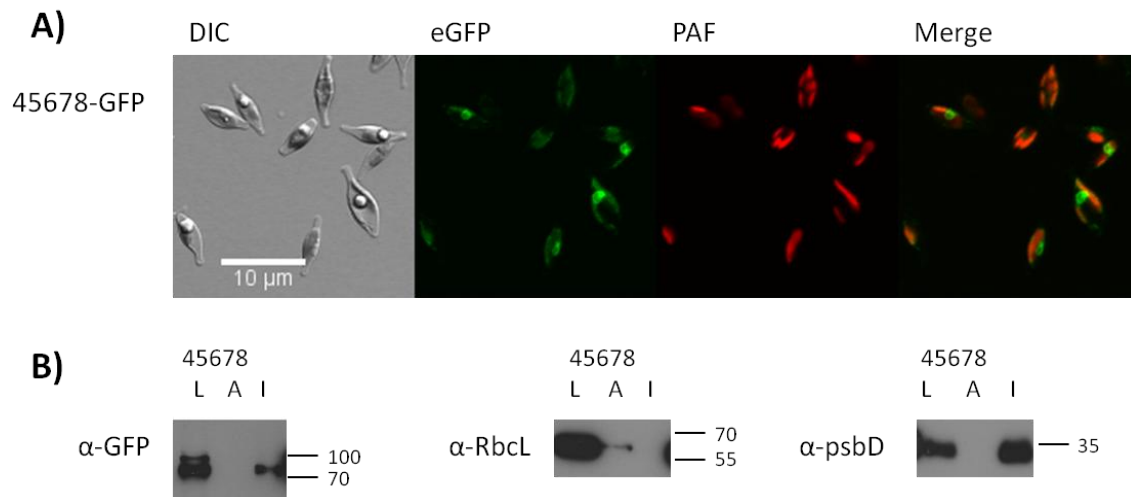


Abbildung 10: In vivo Lokalisation und Carbonatextraktion von 45678: A) Die Abbildung zeigt die Lokalisation des Fusionsproteins 45678 mit einem C-terminalen eGFP. Die Fluoreszenz ist sehr konzentriert in der Kernhülle zu beobachten sowie etwas schwächer um die Plastide herum in der cER-Membran. DIC: *differential interference contrast*, PAF: Plastidenautofluoreszenz, Merge: Überlagerung des eGFP und PAF Kanals. B) Die Membranintegration wurde durch Carbonatextraktion überprüft. Das Signal für 45678 wurde bei der erwarteten Größe von etwa 70 kDa in der löslichen Fraktion (L) und der integralen Membranfraktion (I) detektiert. Die Kontrollen für die lösliche Fraktion (RbcL, 55 kDa) und die integrale Fraktion (psbD, 35 kDa) zeigen eine gelungene Fraktionierung.

3.1.2.5 Lokalisationen in der Plastide

Fünf der 23 lokalisierten Proteine zeigten eine plastidäre Lokalisation (s. Abb. 11). Das Fluoreszenzmuster deckte sich komplett mit der Plastidenautofluoreszenz, was eine Lokalisation in der äußeren Chloroplastenmembran unwahrscheinlich macht. Die fünf Proteine 23673, 30562, 43598, 48025 und 48890 wurden durch die Algorithmen PSORTb und TMBETADISC als β -barrel vorhergesagt. Mit Ausnahme von 43598 wurden sie auch durch TMBETA-net als β -barrel Protein eingestuft. Außerdem charakterisierte Pred-TMBB 23673 ebenfalls als β -barrel, auch wenn eine spätere Analyse durch TOPCONS eine α -helicale Transmembrandomäne vorhersagte. Eine BLAST-Analyse ergab für 30562 eine potentielle Rolle im Transport von Kobalt- oder Magnesiumionen und ordnete dem Protein 48025 eine mögliche Funktion als DnaJ *heat shock protein* zu (s. Tabelle 2). Mit Ausnahme von 43598 zeigten alle plastidär lokalisierten Proteine an der vorhergesagten Schnittstelle des Signalpeptids eine aromatische Aminosäure oder Leucin.

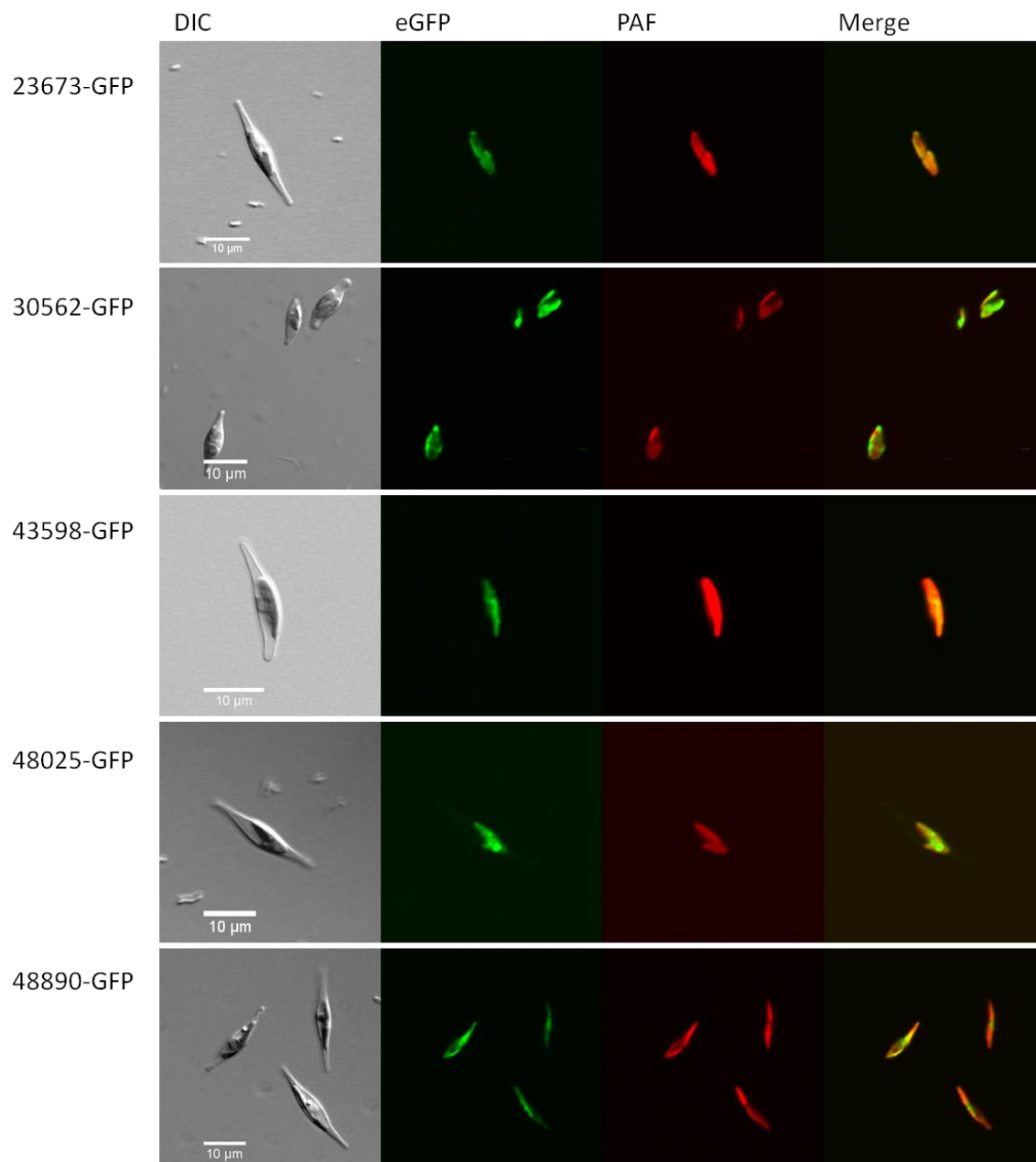


Abbildung 11: *In vivo* Lokalisationen der Proteine 23673, 30562, 43598, 48025 und 48890: Die Abbildung zeigt die Lokalisationen der Fusionsproteine 23673, 30562, 43598, 48025 und 48890 mit einem C-terminalen eGFP. Alle Proteine zeigen eine plastidäre Lokalisation. Die eGFP-Fluoreszenz ist deckungsgleich mit der Plastidenautofluoreszenz. Im Falle von 48025 können sogar einige Akkumulationen innerhalb der Plastide beobachtet werden. Das Fluoreszenzmuster weist auf einen Transport über die innere Chloroplastenmembran hinweg hin und macht eine Lokalisation in der äußeren Chloroplastenmembran unwahrscheinlich. DIC: *differential interference contrast*, PAF: Plastidenautofluoreszenz, Merge: Überlagerung des eGFP und PAF Kanals.

Alle plastidären Proteine wurden nach erfolgter Lokalisation auch auf ihre Membranintegration hin untersucht. Durch Carbonatextraktion konnten die Proteine 30562, 43598 und 48890 als lösliche Proteine identifiziert werden (s. Abb. 12B, C, E). Das Signal für 48890 wurde bei einer Masse von etwa 130 kDa detektiert wurde, obwohl die erwartete Größe nur etwa 85 kDa betrug (s. Abb. 12E). Das Protein 23673 konnte zweifelsfrei als integrales Membranprotein charakterisiert

werden (s. Abb. 12A). Das Signal wurde bei etwa 55 kDa detektiert, die vorhergesagte Größe des Proteins 23673 lag jedoch bei etwa 68 kDa. Die Ergebnisse der Carbonatextraktion für 48025 sind nicht eindeutig. So wurden insgesamt vier Klone untersucht und jeweils zwei zeigten nur ein Signal in der löslichen Fraktion und zwei ein zusätzliches Signal in der integralen Membranfraktion, sodass hier keine genaue Aussage getroffen werden kann, und weitere Analysen notwendig sind um die Membranintegration von 48025 zu bestätigen. Exemplarisch wird für 48025 eine Carbonatextraktion gezeigt, welche 48025 als integrales Membranprotein identifiziert (s. Abb. 12D).

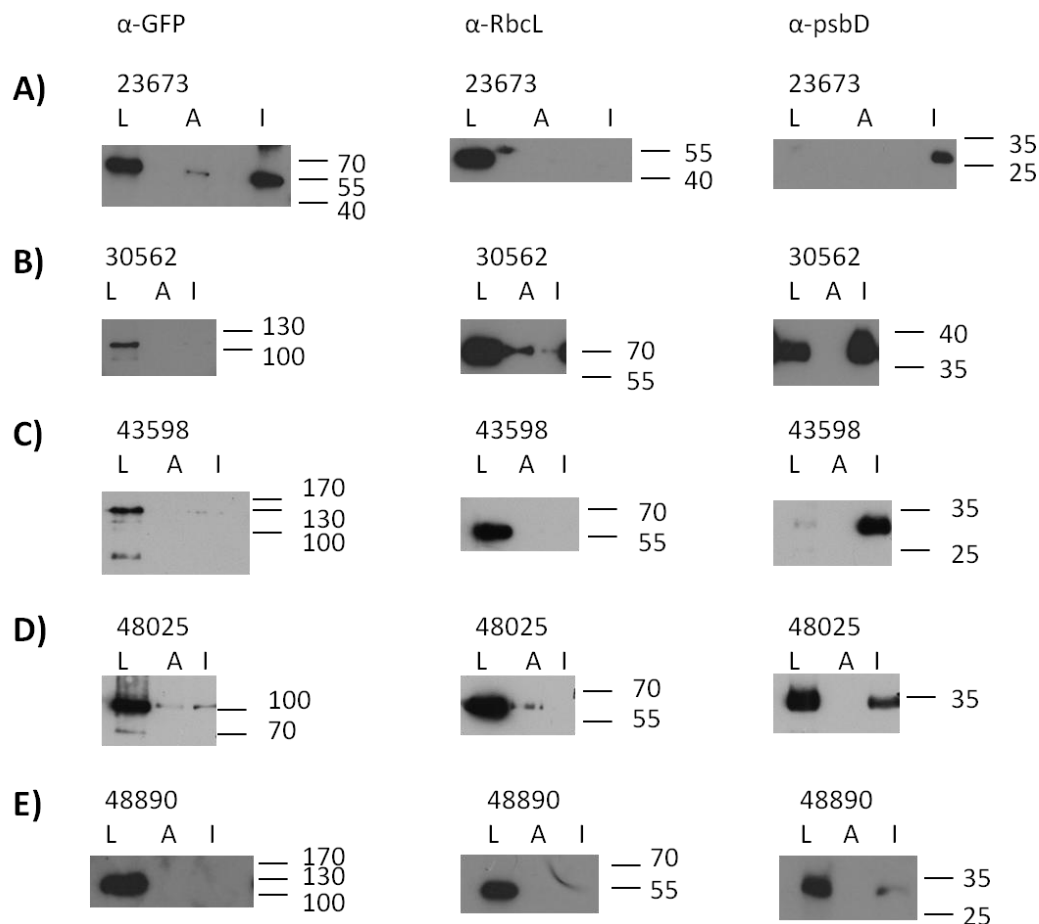


Abbildung 12: Überprüfung der Membranintegration der plastidär lokalisierten Proteine 23673, 30562, 43598, 48025 und 48890: A) Die Carbonatextraktion des Proteins 23673 zeigte ein Signal in der löslichen (L), assoziierten (A) und integralen (I) Fraktion bei einer Größe von etwa 55 kDa. Die vorhergesagte Proteinmasse betrug 68 kDa. Die Kontrollen zeigen eine erfolgreiche Trennung der Fraktionen an. RbcL (55 kDa) wurde nur in der löslichen Fraktion und psbD (35 kDa) nur in der integralen Membranfraktion detektiert. B) Das Protein 30562 ist ein lösliches Protein. Das Signal wird bei der erwarteten Größe von etwa 118 kDa nur in der löslichen Fraktion detektiert. Die Kontrollen zeigen eine unsaubere Auftrennung der einzelnen Fraktionen, da der lösliche Marker in allen Fraktionen detektiert wird. Dennoch ist das Protein 30562 eindeutig löslich. C) Die Carbonatextraktion des Proteins 43598 ergab, dass 43598 ein lösliches Protein ist. Es wurde bei der erwarteten Größe von 115 kDa nur in der löslichen Fraktion detektiert. Die Kontrollen zeigen eine saubere Auftrennung der Fraktionen. D) Das Protein 48025 wurde in dieser Carbonatextraktion in allen Fraktionen bei einer Größe von etwa 100 kDa detektiert, die erwartete Größe betrug etwa 90 kDa. Die Kontrollen zeigen auch hier eine saubere Auftrennung der Fraktionen. E) Die Carbonatextraktion des Proteins 48890 identifizierte es als lösliches Protein bei einer Größe von etwa 130 kDa, obwohl die erwartete Größe nur etwa 85 kDa betrug. Die Kontrollen zeigen eine saubere Trennung der Fraktionen an.

3.2 Untersuchung der Subkompartimentierung des endoplasmatischen Retikulums in *Phaeodactylum tricornutum*

Lokalisationsstudien ER-residenter Membranproteine in *P. tricornutum* zeigten eine unterschiedliche Verteilung einzelner Proteine. So konnten Transporterproteine wie die Aquaporine Mip1a und Mip1b verstärkt im cER beobachtet werden, wohingegen Sec61 α und hDer1-2 im gesamten ER lokalisiert wurden (Liu et al. 2016). Diese Beobachtung führte zur Annahme, dass im cER möglicherweise hauptsächlich der Transport von Proteinen und Metaboliten stattfindet, im hER jedoch nur in verringertem Umfang. Eine solche Aufgabenteilung könnte sich auch auf die Verteilung von Faktoren der Proteinfaltung auswirken. Deshalb wurden die Faktoren der UPR in *P. tricornutum* identifiziert, lokalisiert und mit anderen ER-residenten Membranproteinen verglichen.

3.2.1 Identifizierung von Faktoren der UPR in Organismen mit komplexen Plastiden

Durch BLAST-Analysen konnten Homologe von IRE1 und PERK in der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* identifiziert werden. Auch verwandte Spezies wiesen Homologe dieser beiden Proteine auf. In Tabelle 3 sind die ermittelten Homologe mit ihrer ID aus der entsprechenden Genomdatenbank hinterlegt. In den hier untersuchten Organismen mit roten komplexen Plastiden, deren äußerste Membran im Kontinuum mit dem NE steht, konnten bis auf eine Ausnahme jeweils beide hier betrachteten Rezeptoren der UPR identifiziert werden. Nicht alle Spezies mit komplexer Plastide roten Ursprungs besitzen jedoch Homologe von IRE1 und PERK. In *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* wurde kein Homolog von IRE1 nachgewiesen (Gosline et al. 2011; Narasimhan et al. 2008). Dasselbe gilt für andere Parasiten wie *Leishmania donovani* oder *Trypanosoma brucei* (Goldshmidt et al. 2010; Gosline et al. 2011; Moraes et al. 2007). Auch in der Cryptophyte *Guillardia theta* konnte nur ein Faktor der UPR detektiert werden, so besitzt *G. theta* ein Homolog von IRE1, jedoch nicht von PERK. In der Chlorarachniophyte *Bigelowiella natans*, einem Organismus mit grüner komplexer Plastide mit vier Membranen, konnte in dieser Analyse ebenfalls nur ein putatives IRE1 ermittelt werden. Es konnte in *P. tricornutum* ein Genmodell (ID 49205) mit Homologien zu ATF6 identifiziert werden, allerdings zeigten Transkript-Studien, dass das vorhergesagte Genmodell falsch war. Die vorhergesagte Transmembrandomäne des bZIP-Transkriptionsfaktors war innerhalb eines Introns kodiert.

Tabelle 3: Identifizierung putativer Homologe von IRE1 und PERK in Organismen mit komplexen Plastiden: Es konnten Homologe von IRE1 und PERK in *P. tricornutum*, *T. pseudonana*, *E. siliculosus*, *N. gaditana* und *E. huxleyi* identifiziert werden. In *G. theta* und *B. natans* konnte in dieser Analyse nur je ein putatives IRE1 nachgewiesen werden. Die Daten für *T. gondii* und *P. falciparum* wurden von Gosline et al. übernommen (Gosline et al. 2011).

Organismus	IRE1	PERK
<i>P. tricornutum</i>	45363	44445
<i>T. pseudonana</i>	36798	20991
<i>E. siliculosus</i>	Esi_0475_0012	Esi_0281_0042
<i>N. gaditana</i>	NGA_0020269	NGA_0036802
<i>E. huxleyi</i>	121319	267929
<i>G. theta</i>	70775	-
<i>T. gondii</i>	-	TGME49_229630
<i>P. falciparum</i>	-	PF3D7_0628200
<i>B. natans</i>	80175	-

Im Rahmen der hier durchgeführten BLAST-Analyse und manuellen Überprüfung in den Genomdatenbanken konnten putative Homologe von IRE1 und PERK identifiziert werden. Die beiden Homologe in *T. pseudonana* sind jeweils nur C-terminal durch EST-Daten belegt. Das putative IRE1-Homolog von *E. siliculosus* wird nur durch eine einzige, sehr kurze EST-Sequenz unterstützt. Das Genmodell für PERK weist keine luminal Domäne auf und wird nicht vollständig durch EST-Sequenzen abgedeckt. Beide Genmodelle von *N. gaditana* sind unvollständig von EST-Sequenzen abgedeckt und die luminal Domänen fehlen. Auch das identifizierte IRE1-Homolog von *E. huxleyi* ist unvollständig und nur C-terminal durch EST-Daten abgedeckt, wohingegen das PERK-Homolog bis auf den N-Terminus durch EST-Daten gestützt wird. In *G. theta* konnte kein PERK-Homolog identifiziert werden. Das ermittelte IRE1-Homolog ist unvollständig, da der N-Terminus mit der luminal Domäne fehlt. Der C-Terminus wird jedoch durch EST-Daten abgedeckt. Auch in *B. natans* konnte nur ein IRE1-Homolog identifiziert werden. Das Modell ist unvollständig und musste C-terminal erweitert werden. Es wird jedoch mit Ausnahme des N-Terminus durch EST-Daten gestützt. Die Untersuchung konnte kein putatives Xpb1/Hac1 identifizieren, da dieser Faktor keine konservierte Sequenz zeigt und daher BLAST-Analysen nicht ausreichend sensitiv sind.

3.2.2 Markierung von Subkompartimenten des endoplasmatischen Retikulums in *Phaeodactylum tricornutum*

Um eine Kolokalisation der verschiedenen Faktoren zu ermöglichen, wurden einige Konstrukte in den dualen Transfektionsvektor umklont. Die bereits lokalisierten Proteine hDer1-2 und Tpt1 wurden mit einem C-terminalen mRFP fusioniert und zusammen mit den hauptsächlich im cER lokalisierten Aquaporinen Mip1a und Mip1b in einem dualen Transfektionsvektor in *P. tricornutum* transfiziert (Hempel et al. 2009; Liu et al. 2016; Moog et al. 2015). In Abbildung 13 sind die ER-Lokalisationen bereits bekannter ER-Membranproteine dargestellt. So zeigen hDer1-2 und Sec61 α eine typische ER-Fluoreszenz, die das gesamte ER markiert. Die Fluoreszenz umschließt die Plastide deutlich und markiert das cER und die Kernhülle. Zusätzlich werden hier auch Bereiche im Cytosol markiert, welche dem hER entsprechen (s. Abb. 14). Vergleicht man dieses Muster mit dem eines Aquaporins Mip1b, welches bereits als hauptsächlich im cER lokalisiert publiziert wurde, so ist klar zu beobachten, dass es sich hier um unterschiedliche Lokalisationen innerhalb desselben Organells handelt (Liu et al. 2016). Mip1b lokalisiert hauptsächlich in der Kernhülle und dem cER, nur in einer sehr geringen Konzentration im hER. Das Bildmaterial für hDer1-2 und Sec61 α wurde von Dr. Franziska Hempel beziehungsweise Dr. Simone Stork zur Verfügung gestellt.

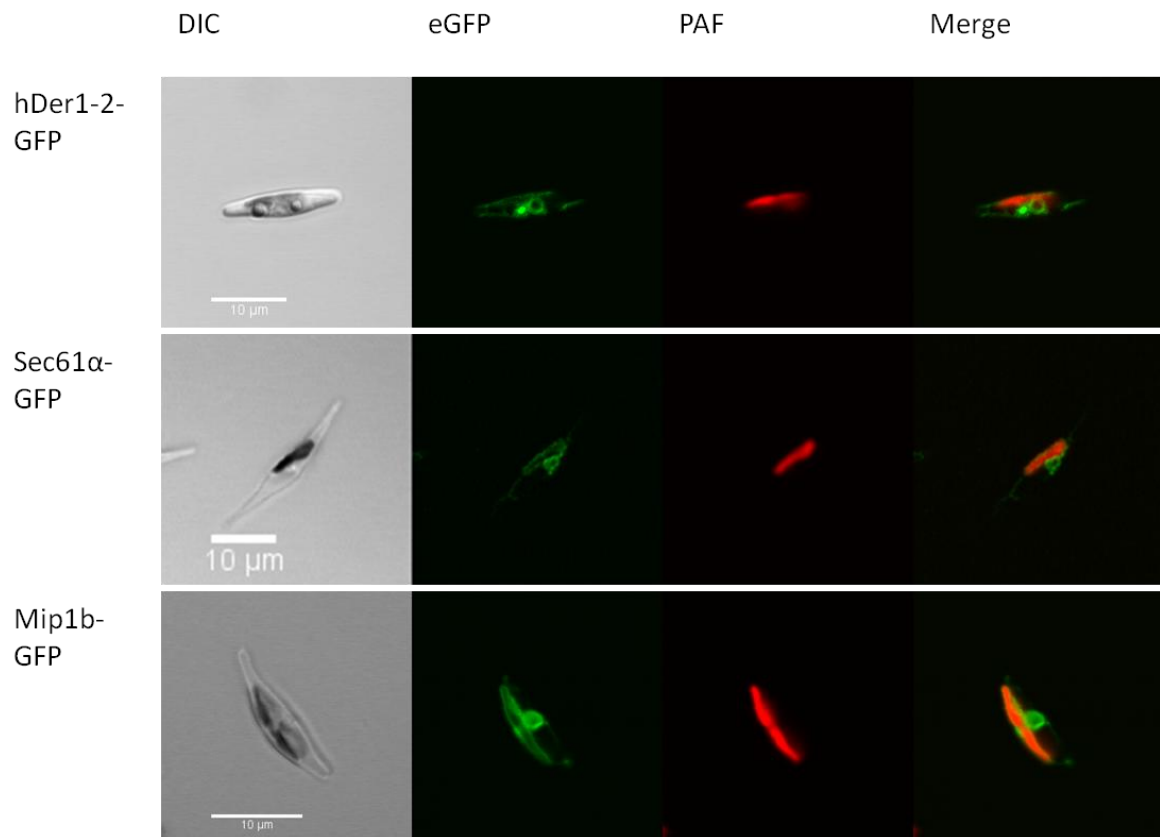


Abbildung 13: In vivo Lokalisationen von ER-Membranproteinen: Im oberen Drittel der Abbildung wird das Fluoreszenzmuster des ERAD-Faktors hDer1-2 fusioniert mit einem C-terminalen eGFP gezeigt. Die Fluoreszenz umschließt deutlich die Plastide, markiert die Kernhülle und weitere Regionen des ERs abseits der Plastide. Im mittleren Teil der Abbildung kann man dasselbe Fluoreszenzmuster wie zuvor beobachten. Hier wurde die membranständige α -Untereinheit des Sec61-Translokons mit einem C-terminalen eGFP fusioniert. Im unteren Teil der Abbildung wird eine klassische cER-Lokalisation anhand des Beispiels Mip1b mit einem C-terminalen eGFP gezeigt. Im Gegensatz zu den beiden oberen Konstrukten wird Mip1b hauptsächlich in der Kernhülle und um die Plastide herum im cER detektiert. DIC: *differential interference contrast*, PAF: Plastidenautofluoreszenz, Merge: Überlagerung des eGFP und PAF Kanals.

Zunächst wurden Kolokalisationen der ausgewählten Markerproteine mit bereits lokalisierten cER-Membranproteinen durchgeführt, um die mit mRFP fusionierten Markerproteine zu überprüfen. In Abbildung 14 ist zu erkennen, dass die beiden cER-Membranproteine Mip1a und Mip1b nur teilweise mit dem ER-Marker hDer1-2 kolokalisieren. Tatsächlich gibt es Regionen des ERs, welche nur durch den Marker des gesamten ERs hDer1-2 angefärbt werden. Die hauptsächliche Lokalisation des Triosephosphattransporters Tpt1 im cER und der Kernhülle konnte durch eine vollständige Kolokalisation mit den Aquaporinen bestätigt werden (s. Abb. 14).

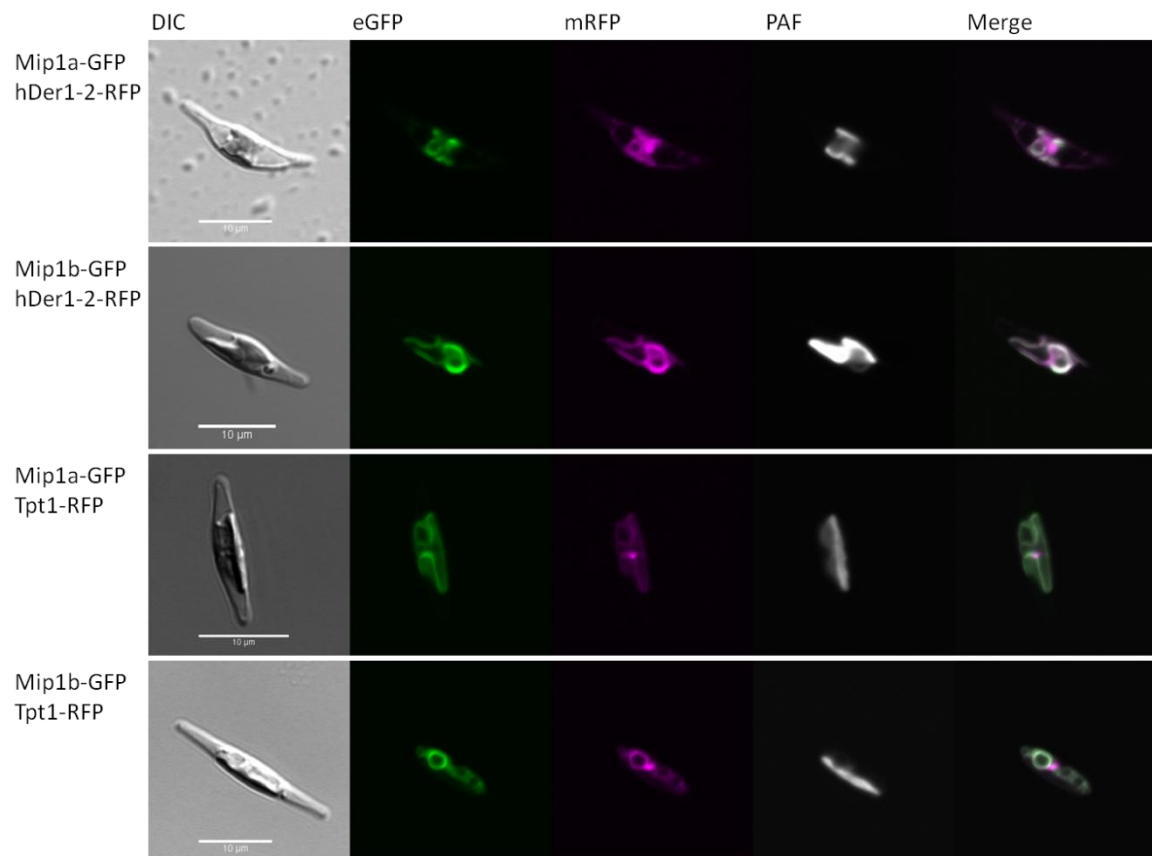


Abbildung 14: *In vivo* Kolokalisationen des ER-Markers hDer1-2 und cER-Markers Tpt1 mit cER-Membranproteinen:

Im oberen Teil der Abbildung wird die Kolokalisation des Markers für das gesamte ER hDer1-2 mit C-terminalem mRFP und den Aquaporinen Mip1a beziehungsweise Mip1b mit C-terminalem eGFP gezeigt. Die Fluoreszenz der Aquaporine konzentriert sich vorwiegend auf das cER und die Kernhülle. Das Fluoreszenzmuster von hDer1-2-mRFP hingegen zeigt ebenfalls eine Markierung des cERs um die Plastide herum, jedoch werden auch schwach noch weitere Bereiche abseits der Plastide, das hER markiert. Der Overlay der beiden Fluoreszenzen zeigt eine unvollständige Überlappung. hDer1-2 und die Aquaporine lokalisieren in unterschiedlichen, zum Teil aber auch in denselben Regionen des ERs. Im unteren Teil der Abbildung werden die Kolokalisationen der Aquaporine Mip1a und Mip1b mit dem Triosephosphattransporter Tpt1 gezeigt. Die beiden Fluoreszenzen sind beinahe vollständig deckungsgleich. Alle drei Konstrukte sind hauptsächlich im cER und der Kernhülle zu beobachten, jedoch nur in geringer Konzentration in anderen Bereichen des ERs. DIC: *differential interference contrast*, PAF: Plastidenautofluoreszenz, Merge: Überlagerung des eGFP und mRFP Kanals.

3.2.3 Lokalisation von IRE1 und PERK im *hostER*

Nach erfolgter *in silico* Analyse wurden die Genmodelle von IRE1 und PERK durch Amplifikation von cDNA überprüft und C-terminal mit eGFP fusioniert. IRE1 zeigt die charakteristische Domänenarchitektur. Eine N-terminale luminaire *IRE1-like* Domäne, gefolgt von einer vorhergesagten Transmembrandomäne sowie eine C-terminale Proteinkinase-Domäne und eine für IRE1 spezifische RNase-Domäne wurden durch eine Analyse auf konservierte Domänen (BLAST) identifiziert. Die Analyse konservierter Domänen von PERK zeigte ebenfalls eine N-terminale luminaire *IRE1-like* Domäne, eine nicht gesicherte Vorhersage einer Transmembrandomäne und eine C-terminale Proteinkinase-Domäne, charakteristisch für eIF2 α -Kinasen. Anschließend erfolgte die Expression unter dem induzierbaren Promotor der Nitratreductase. Abbildung 15 zeigt die Lokalisation der Fusionsproteine in voller Länge. Sowohl IRE1, als auch PERK zeigen eine ER-lokalisierte Fluoreszenz. Die Fluoreszenz kann hauptsächlich dem *hostER* zugeordnet werden. Die Plastide wird von der Fluoreszenz größtenteils ausgespart und nur abseits der Plastide werden Regionen des ERs markiert, welche weit ins Cytosol reichen (s. Abb. 15A). Im unteren Teil der Abbildung wird die Carbonatextraktion zur Überprüfung der Membranintegration von PERK dargestellt, da die Vorhersage als Membranprotein als nicht gesichert galt. Die Extraktion zeigt ein klares Signal bei 170 kDa in der löslichen und integralen Fraktion bei einer vorhergesagten Größe des Fusionsproteins von 142 kDa (s. Abb. 15B). Aufgrund einer recht schwachen Expression wurden 10 μ g der integralen Membranfraktion für die Detektion mit dem GFP-Antikörper eingesetzt. Die Kontrollen zeigen eine saubere Auftrennung der einzelnen Fraktionen. PERK ist ein Membranprotein des hERs.

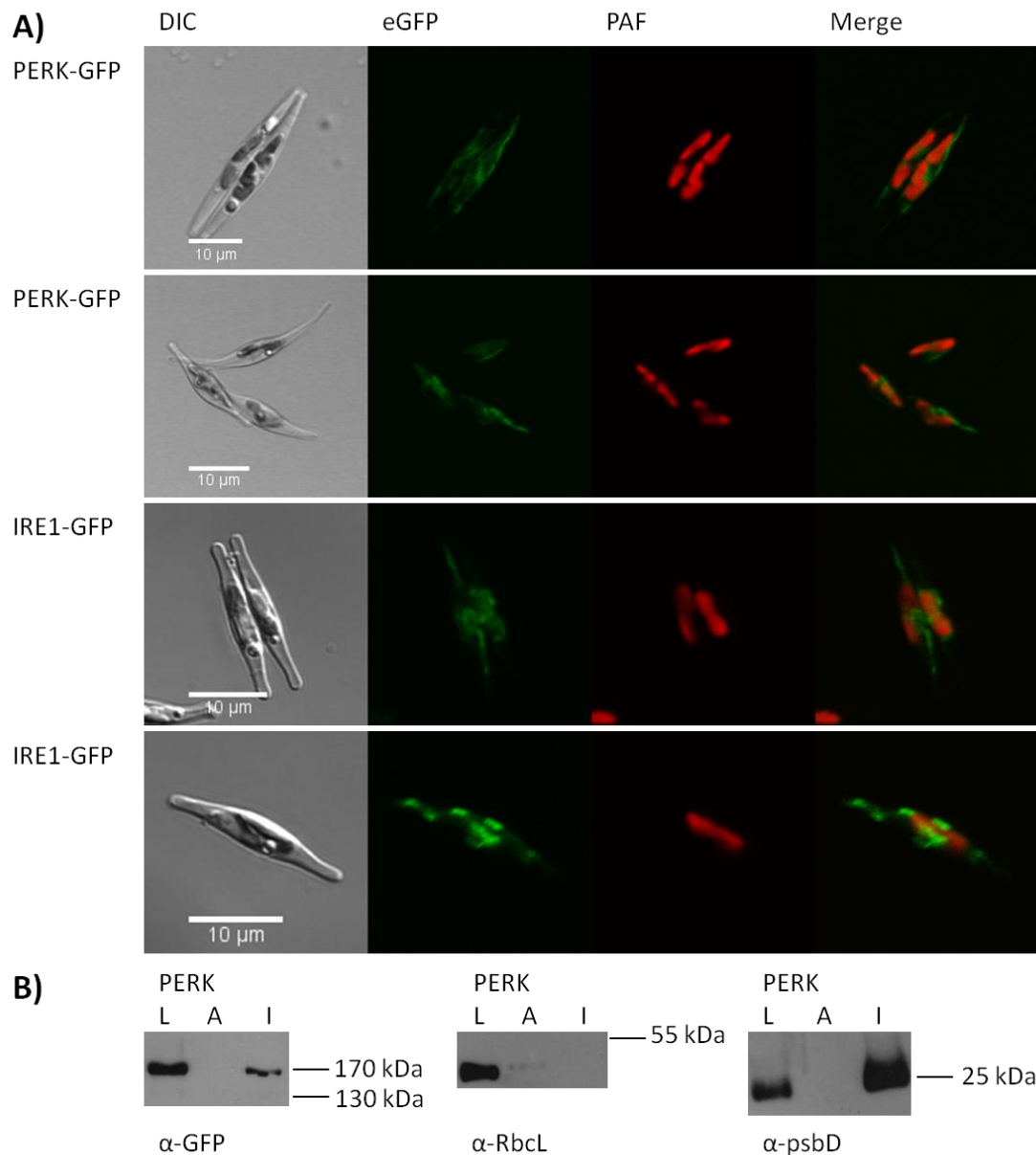


Abbildung 15: In vivo Lokalisation von PERK und IRE1 und Carbonatextraktion von PERK: A) Die Abbildung zeigt im oberen Bereich die Lokalisation von PERK und im unteren Bereich von IRE1 als volle Länge Protein mit einem C-terminal fusionierten eGFP. Beide Proteine zeigen eine ER-lokalisierte Fluoreszenz. Die Fluoreszenz erstreckt sich neben der Plastide und reicht weit ins Cytosol abseits der Plastide hinein. Dieses Fluoreszenzmuster kann hauptsächlich dem sogenannten *hostER* zugeordnet werden. Zum Teil können auch runde Strukturen identifiziert werden, welche der Kernhülle entsprechen. DIC: *differential interference contrast*, PAF: Plastidenautofluoreszenz, Merge: Überlagerung des eGFP und PAF Kanals. B) Dargestellt sind die Ergebnisse der Carbonatextraktion des PERK-eGFP Konstruktes nach 24 Stunden Induktion. Das GFP-Signal kann in der löslichen (L) und integralen (I) Fraktion bei einer Größe von etwa 170 kDa detektiert werden. Die errechnete Größe des Konstruktes lag bei 142 kDa. Die Kontrollen zeigen eine saubere Auftrennung der Fraktionen an. Der lösliche Marker RbcL (55 kDa) wird nur in der löslichen und assoziierten (A), nicht in der integralen Fraktion detektiert. Die Membranintegration von PERK wurde bestätigt.

3.2.4 Kolokalisation von PERK mit hDer1-2

Nachdem die Lokalisation von PERK und IRE1 im endoplasmatischen Retikulum erfolgt war und die Ergebnisse auf eine hauptsächliche Lokalisation innerhalb eines Subkompartiments des ERs, dem hER hindeuteten, wurde für eine Bestätigung dieser Annahme der Versuch einer Kolokalisation mit Markerproteinen für das cER und das gesamte ER unternommen. Um unterschiedliche Expressionsraten aufgrund von verschiedenen Integrationsraten zu vermeiden, wurde auch hier der duale Transfektionsvektor verwendet. Es konnte eine vollständige Überlappung der Fluoreszenzen der beiden Konstrukte beobachtet werden (s. Abb. 16).

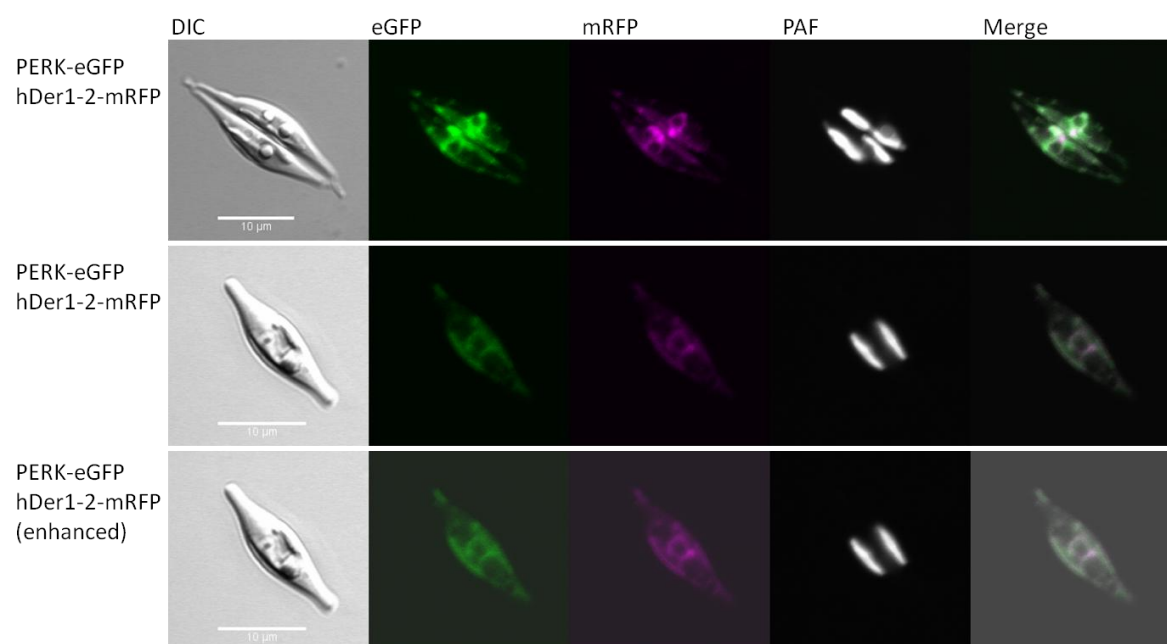


Abbildung 16: *In vivo* Kolokalisation von PERK und hDer1-2: Die Abbildung zeigt die Fluoreszenzmuster eines dualen Konstruktes PERK-eGFP und hDer1-2-mRFP. Die Fluoreszenz ist hauptsächlich um die Plastide herum und in der Kernhülle konzentriert. Schwache Fluoreszenz lässt sich auch abseits der Plastide an den äußersten Enden der Zelle beobachten. Es wird eine vollständige Überlappung der Signale des GFP- und des mRFP-Kanals beobachtet. Im unteren Teil der Abbildung wurde die mittlere Fluoreszenzaufnahme bearbeitet, um die mRFP-Fluoreszenz deutlicher zu machen. eGFP und mRFP-Kanal wurden dabei gleichermaßen modifiziert. DIC: *differential interference contrast*, PAF: Plastidenautofluoreszenz, Merge: Überlagerung des eGFP und mRFP Kanals.

4. Diskussion

4.1 Untersuchung des Proteoms der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* auf plastidäre β -barrel Proteine

Zurzeit ist über die dritte Plastidenmembran komplexer Plastiden nur äußerst wenig bekannt. Tatsächlich wurde bislang nur ein Homolog von Toc75 in *P. tricornutum* identifiziert (Bullmann et al. 2010). Die äußere Plastidenmembran beziehungsweise ihr Homolog in Diatomeen weisen einzigartige Membranproteine auf, die sogenannten β -barrel Proteine. β -barrel Proteine sind charakteristisch für die äußeren Membranen von Gram-negativen Bakterien, Mitochondrien und Plastiden, weshalb sie innerhalb von komplexen Plastiden mutmaßlich nur in einer Membran vorkommen sollten (Kim et al. 2007). Sie werden in der Membran nicht durch α -Helices verankert, sondern bilden mit anti-parallel angeordneten β -Faltblättern und stabilisierenden Wasserstoffbrücken eine fassförmige Struktur aus, mit welcher das Protein in der Membran verankert wird. In Mitochondrien und primären Plastiden werden die neu synthetisierten β -barrel Proteine (OMPs) mutmaßlich aus dem Intermembranraum des Organells in die äußere Membran inseriert (Misra 2012). Im Falle von Gram-negativen Bakterien beginnt die Insertion der OMPs im Periplasma unter Beteiligung von periplasmatischen Chaperonen und dem BAM-Komplex (Heuck et al. 2011; Kim et al. 2007).

Mit dem Ziel der Identifizierung weiterer Komponenten der dritten Plastidenmembran wurde zunächst durch eine BLAST-Analyse nach Homologen aus primären Plastiden bekannten Proteinen der äußeren Membran gesucht. Diese Analyse verlief ergebnislos. Deshalb wurde die Vorhersage von β -barrel Proteinen (OMPs) aus dem gesamten Proteom von *P. tricornutum* mit dem Algorithmus PSORTb 3.0 durchgeführt (Yu et al. 2010). Die Analyse ergab insgesamt 24 vorhergesagte putative OMPs. Zuvor wurden mehrere Algorithmen mit der bereits bekannten Sequenz von ptOMP85 getestet. Es sprachen mehrere Gründe für die Verwendung von PSORTb 3.0. Zunächst analysiert PSORTb eine ganze Reihe verschiedener Parameter, unter anderem bezieht es auch das Vorhandensein von α -Helices in seine Vorhersagen mit ein, wohingegen andere Algorithmen dies nicht tun und wesentlich weniger Parameter überprüfen (Yu et al. 2010). Außerdem konnte PSORTb ptOMP85 korrekt als OMP identifizieren. Des Weiteren ermöglicht es PSORTb ein ganzes Proteom zu analysieren, was ebenfalls nicht mit allen zugänglichen Vorhersagealgorithmen möglich ist. Ein weiterer Faktor bei der Auswahl dieses Algorithmus war die Empfehlung durch eine andere Publikation (Hayat und Elofsson 2012). In Kombination mit der Topologie-Vorhersage durch BOCTOPUS1 konnte die Zahl falsch positiver Vorhersagen deutlich reduziert werden, ein Algorithmus der im Laufe des Projekts durch BOCTOPUS2 ersetzt werden musste (Hayat und Elofsson 2012; Hayat et al. 2016). Allerdings konnten mit diesem Ansatz keine

Kandidaten für Tom40 oder Sam50 detektiert werden, weshalb der Datensatz im späteren Verlauf der Analyse nochmals erweitert werden musste. So konnten durch BLAST-Analysen Homologe von Tom40 und Sam50 identifiziert werden. Das putative Tom40 wurde durch PSORTb nicht als OMP, sondern als extrazellulär vorhergesagt, wohingegen das putative Sam50, nachdem das Genmodell manuell korrigiert wurde, ebenfalls als OMP charakterisiert wurde. Aufgrund der fehlerhaften Vorhersage des mutmaßlichen Tom40 wurde der Datensatz mit extrazellulär vorhergesagten Proteinen erweitert. Es wurden nur Proteine weiter bearbeitet, von welchen Homologe in anderen Organismen mit komplexen rhodophytischen Plastiden durch BLAST identifiziert werden konnten, die von mindestens einem β -barrel Vorhersagealgorithmus als OMP vorhergesagt wurden und keine α -Helices enthielten. Die gesamte Analyse ergab 30 Kandidaten mit den notwendigen Zielsteuerungssequenzen, welche anschließend kloniert und C-terminal mit eGFP fusioniert wurden. Von diesen 30 konnten lediglich 23 lokalisiert werden. Vier weitere Kandidaten wurden als falsche Vorhersagen bewertet, da entweder das zugrunde liegende Genmodell und die damit einhergehenden Vorhersagen falsch waren oder aber eine Amplifikation von cDNA oder gDNA nicht möglich war. Drei Kandidaten konnten nicht mehr lokalisiert werden. Vier Proteine wurden in der Plasmamembran, vier im Cytosol, fünf in noch nicht geklärten Organellen oder Kompartimenten, vier im endoplasmatischen Retikulum, eines im cER und fünf innerhalb der Plastide lokalisiert. Die Lokalisationen lassen den Schluss zu, dass es sich bei keinem dieser Proteine um ein β -barrel Protein handelt und die angewandten Analysen keine neuen OMPs identifizieren konnten. Die Fluoreszenz der plastidären Proteine lässt darauf schließen, dass sie nicht in der dritten Membran, sondern darüber hinaus ins Stroma beziehungsweise in andere plastidäre Membranen und Kompartimente transportiert wurden. Auch die Vorhersage von α -helicalen Transmembrandomänen im Falle der meisten in einer Membran inserierten Proteine, die durch eine Carbonatextraktion überprüft wurden, spricht gegen ein tatsächliches β -barrel Protein. Lediglich 34389 könnte möglicherweise ein mitochondriales β -barrel Protein sein. Es wurde durch Carbonatextraktion gezeigt, dass es ein integrales Membranprotein ist, jedoch ist die Lokalisation noch ungeklärt. Die Fluoreszenz weist Ähnlichkeiten zu bereits bekannten mitochondrialen Proteinen auf. Die *in silico* Analyse zeigt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine mitochondriale Zielsteuerungssequenz an und es wurden durch TOPCONS keine α -Helices vorhergesagt. Weitere Analysen sind erforderlich, um dies zu überprüfen.

Die Vorhersagen von β -barrel Proteinen stützt sich in den meisten Fällen auf Algorithmen, welche lediglich mit den Sequenzen bekannter β -barrel Proteine von Prokaryoten trainiert und entwickelt wurden (Gromiha et al. 2005; Ou et al. 2008). Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Beschaffenheit der vorhergesagten Transmembrandomänen. Die β -Faltblätter, welche anti-parallel angeordnet die Membran durchspannenden, sind aufgrund ihrer Länge von lediglich 5-8

Aminosäuren und ihrer gewissermaßen unabhängigen Position zueinander schwer zu analysieren (Gromiha et al. 2005). Weiterhin zeigen OMPs keine charakteristischen hydrophoben Bereiche, wie dies in α -helicalen Transmembranproteinen der Fall ist (Ou et al. 2008). Außerdem basieren einige Algorithmen auch auf dem Prinzip der Homologie. So werden die zu analysierenden Sequenzen lediglich mit Sequenzen von bekannten die Membran durchspannenden β -Strängen verglichen und darauf aufbauend die Vorhersage getroffen (Berven et al. 2004). Des Weiteren sind die Algorithmen zum Teil auch äußerst beschränkt in der Anzahl der während der Entwicklung genutzten Sequenzen. Der Algorithmus Pred-TMBB zum Beispiel wurde nur mit einem Datensatz von 16 OMPs entwickelt (Bagos et al. 2004b). Auch in neueren Analysen wird auf die wenigen vorhandenen Daten verwiesen. So wird in einer Studie zur Entwicklung eines weiteren Vorhersagealgorithmus vermerkt, dass es lediglich 162 bekannte Proteinstrukturen gibt, auf welchen die Datensätze aufbauen können und dadurch die Qualität der Vorhersagen beeinflusst wird (Roy Choudhury und Novic 2015). Andere Algorithmen begrenzen aufgrund ihrer Vorgaben bereits die Möglichkeiten zur Analyse kompletter Genome. Ein Beispiel dafür ist TMBpro, das die maximale Länge eines Proteins auf 800 Aminosäuren begrenzt und kein Modell größerer Proteine erstellt (Randall et al. 2008). Auch Pred-TMBB ermöglicht keine Genomanalyse, da nur eine Analyse einzelner Proteinsequenzen möglich ist. Die Analyse eines eukaryotischen Genoms auf β -barrel Proteine wird durch die vorhandenen Möglichkeiten ebenfalls nicht unterstützt, da der prokaryotische Ursprung der β -barrel Proteine die Entwickler dieser Vorhersagealgorithmen zur Identifizierung und Charakterisierung dieser Proteine auf Prokaryoten beschränkt, obwohl β -barrel Proteine auch in Eukaryoten wichtige Funktionen erfüllen, dort jedoch vermutlich noch seltener zu finden sind als in Prokaryoten.

Es ist unklar, ob die Evolution von OMPs in Eukaryoten möglicherweise die in Prokaryoten konservierten Merkmale etwas abgewandelt hat und damit die Vorhersage und Identifizierung erschwert. Darüber hinaus berücksichtigen die Algorithmen im Regelfall keine potentiellen α -helicalen Transmembrandomänen, was auch in dieser Analyse deutlich wird. So wird in einigen Kandidaten eine α -helicale Transmembrandomäne vorhergesagt und dennoch ordnen es zuweilen drei oder vier Vorhersagen als β -barrel Protein ein, als Beispiel sei hier 23673 genannt (s. 3.1.1). Ein weiterer Punkt, welcher berücksichtigt werden muss, liegt im untersuchten Organismus selbst begründet. Plastidäre β -barrel Proteine von *P. tricornutum* müssen zwei Membranen überqueren bevor sie ins PPC gelangen, dem reduzierten Cytosol des Endosymbionten. Um also in das Kompartiment zu gelangen, in welchem sie durch einen unbekannten Mechanismus in die dritte Plastidenmembran inseriert werden können, benötigen sie eine BTS. Im Regelfall besitzen OMPs jedoch keine N-terminalen Zielsteuerungssequenzen, mit Ausnahme eines Signalpeptids in Gram-negativen Bakterien für den Export ins Periplasma (Noinaj et al. 2014). Dementsprechend müssen

OMPs komplexer Plastiden zunächst ein Signalpeptid und eine Transitpeptid-ähnliche Sequenz am N-Terminus entwickeln bevor sie korrekt transportiert werden können. Ausnahmen hiervon sind Toc75 und OEP80, welche abspaltbare N-terminale Zielsteuerungssequenzen aufweisen (Bullmann et al. 2010; Day et al. 2014; Sommer et al. 2011). In welcher Art und Weise die Evolution also Einfluss auf den korrekten Transport und die Eigenschaften plastidärer β -barrel Proteine in Organismen mit komplexen Plastiden genommen hat und damit auch auf ihre Vorhersage, bleibt ungeklärt.

Die der Vorhersage zugrunde liegenden Genmodelle wurden durch verschiedene Algorithmen vorhergesagt und beinhalten unvollständige und falsche Genmodelle, obwohl zum Teil auch EST-Daten zugänglich wären, welche die Modelle als falsch identifizieren. Um eine vollständige Analyse des vorhergesagten Proteoms erfolgreich durchführen zu können, müsste jedes der etwa 56.000 Genmodelle manuell überprüft, korrigiert und doppelte beziehungsweise falsche Modelle aus dem Datensatz entfernt werden. Weiterhin wäre eine intensive Analyse auf α -helicale Transmembrandomänen empfehlenswert. Erst nach einer solchen Voranalyse ist eine umfassende und korrekte Vorhersage von β -barrel Proteinen möglich. Als Beispiel hierfür sei das putative Sam50 genannt, das zunächst mit einem falschen Genmodell durch PSORTb als unbekannt eingestuft wurde, jedoch nach Identifizierung durch eine BLAST-Analyse und manuelle Korrektur des Genmodells positiv mit PSORTb als OMP getestet wurde. Es wurde auch eine BLAST-Analyse bereits bekannter Proteine der äußeren Chloroplastenmembran durchgeführt. Allerdings ist eine solche Analyse meist nicht sensitiv genug beziehungsweise die Proteine sind in ihrer Sequenz nicht ausreichend konserviert, um über diesen Ansatz Homologe zu identifizieren. Deshalb konnten so keine putativen Komponenten der dritten Membran detektiert werden.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die Analyse keine neuen plastidären β -barrel Proteine identifizieren konnte, obwohl unter den als positiv identifizierten Kandidaten das bereits beschriebene ptOMP85, ein putativ mitochondriales Sam50 und Tom40 waren. Die beiden Letzteren dienten als interne Kontrollen und zeigen, dass der Ansatz mit PSORTb beziehungsweise der erweiterte Datensatz zumindest zwei wahrscheinliche β -barrel Proteine identifizieren konnte, wenn auch nicht in der dritten Plastidenmembran, deren Bestandteile weiterhin unbekannt bleiben.

4.2 Subkompartimentierung des endoplasmatischen Retikulums

4.2.1 Die UPR ist hauptsächlich auf das hER beschränkt

Das endoplasmatische Retikulum ist ein wichtiges Organell in eukaryotischen Zellen. Seine Aufgaben liegen unter anderem in der Calciumspeicherung, Proteinfaltung, Lipidsynthese und dem Proteintransport (Görlich et al. 1992; Joshi et al. 2016; Rolls et al. 2002). Rein morphologisch können bereits drei Subkompartimente des ERs unterschieden werden. Das raue ER (rER) ist besetzt mit Ribosomen, welche zusammen mit dem Sec61-Translokon Proteinsynthese und -import abwickeln (Görlich et al. 1992). Der Zellkern und das Genom sind durch die Kernhülle oder *nuclear envelope* (NE) vom Cytoplasma getrennt, welche durch die Präsenz von Kernporenkomplexen charakterisiert wird (Denais et al. 2016; Peyro et al. 2015). Des Weiteren weist auch die innere Kernhülle Besonderheiten auf und formt das sogenannte nucleoplasmatische Retikulum (Malhas et al. 2011). Schließlich kann morphologisch noch das sogenannte glatte ER (sER) von den beiden anderen Regionen unterschieden werden. Das sER ist dabei frei von Ribosomen und unter anderem charakterisiert durch sogenannte *exit sites* (Bannykh et al. 1996; Rolls et al. 2002). Dies sind funktionale Subkompartimente, welche ausschließlich der Sekretion von Proteinen dienen (Liu et al. 2017; Maeda et al. 2017; Saito et al. 2009). Um nur eine weitere Funktion zu nennen, die auf spezifische ER-Regionen beschränkt ist, sei hier das peroxisomale Retikulum (pER) erwähnt, das am Transport von Membranproteinen zu Peroxisomen oder sogar deren Entstehung beteiligt ist (Agrawal et al. 2016; Karnik und Trelease 2007; Mayerhofer 2016).

Im Falle von *P. tricornutum* kann eine weitere Besonderheit des ERs beobachtet werden. Hier ist die Plastide innerhalb des Endomembransystems des Wirtes integriert. Die äußerste Plastidenmembran ist im Kontinuum mit der äußeren Kernhülle und damit Teil des ERs. Dieser Teil des ERs wird deshalb auch als Chloroplasten-ER (cER) bezeichnet (Gibbs 1979; Kilian und Kroth 2005; Liu et al. 2016). In einer neueren Publikation wurde bereits eine Kompartimentierung des ERs in ein Wirts-ER (*hostER*), NE und cER, in der Diatomee *P. tricornutum* angedeutet (Liu et al. 2016) (s. Abb. 13 & 14). Das cER und das hER unterscheiden sich mutmaßlich aufgrund der während der Tag- und Nachtstunden unterschiedlichen Last von zu importierenden Proteinen, da im Kern kodierte Proteine durch das cER in die Plastide transportiert werden müssen. Eine Subkompartimentierung kann sowohl die Spezialisierung auf eine Funktion als auch die Abwesenheit einer Funktion zur Folge haben. Diese Annahme sollte durch die Identifizierung und Lokalisation von Faktoren der UPR überprüft werden. Die UPR fasst in höheren Eukaryoten, den Metazoa, drei Rezeptoren in der ER-Membran sowie deren Signalwege zusammen. IRE1, PERK und ATF6 sind für die Wahrnehmung von ER-Stress verantwortlich (Hollien 2013). Dabei wirken

IRE1 und ATF6 auf transkriptioneller Ebene und PERK auf translationaler (Acosta-Alvear et al. 2007; Chen et al. 2002a; Harding et al. 2000b). Während IRE1 und ATF6 die Transkription für die UPR relevanter Zielgene regulieren, sorgt PERK für einen selektiven Translationsstop.

Für das cER konnten bereits generelle ER-Funktionen wie die Proteinsynthese und -import (Sec61 und Ribosomen) sowie Proteindegradation (ERAD-Maschinerie, beispielhaft durch hDer1-2) gezeigt werden (Liu et al. 2016). Außerdem zeigte diese Studie die erhöhte Konzentration von Transporterproteinen im cER. Diese Beobachtung führte zur beschriebenen Annahme der unterschiedlichen Aufgaben des hERs und des cERs. Aufgrund der zugrunde liegenden Physiologie einer Plastide, welche innerhalb des cERs vorliegt, muss der Transport von plastidären Protein durch das cER führen. Sowohl Import als auch Export von Metaboliten und Proteinen an der cER-Membran müssen daher strikt reguliert werden. Die Anwesenheit von hauptsächlich auf die cER-Membran und die Kernhülle beschränkten Transportern wie Tpt1, Mip1a und Mip1b weist bereits auf diese Regulation hin (Liu et al. 2016; Moog et al. 2015) (s. Abb. 14). Diese Funktionen sind möglicherweise nicht notwendig im hER, daher werden diese Proteine nur in geringerer Konzentration im hER detektiert. Eine Funktion, die möglicherweise nur in verringertem Umfang im cER zu beobachten ist, könnte die UPR sein, welche in dieser Arbeit hauptsächlich im hER lokalisiert wurde. Die Diatomee *P. tricornutum* besitzt ein Homolog von IRE1 und PERK (s. Abb. 15). Die Lokalisation zeigt, dass die Fluoreszenz hauptsächlich abseits der Plastide im hER und teilweise im NE zu beobachten ist, wohingegen hDer1-2 sowohl hER, als auch NE und cER markiert (s. Abb. 13 & 16). Der Unterschied in der Fluoreszenz wird deutlich, wenn man die Plastide genauer betrachtet. Im Falle einer cER-Lokalisation wird die Plastide klar durch die Fluoreszenz umschlossen, was für IRE1 und PERK nur in verringertem Maße zutrifft (s. Abb. 14 & 15). Eine Kolokalisation von IRE und PERK mit den Markern für cER (Tpt1) und das gesamte ER (hDer1-2) war nur teilweise erfolgreich. PERK konnte vollständig mit hDer1-2 kolokalisiert werden (s. Abb. 16). Jedoch zeigten PERK und IRE1 jeweils eine verminderte Konzentration in der Kernhülle und im cER. Hier sei kurz auf die Problematik von Kolokalisationen im selben Organell verwiesen. Die räumliche Nähe der Subkompartimente erschwert eine klare Trennung dieser Strukturen. Auch die Expressionsraten der Konstrukte ist ein Faktor, welcher bei der Interpretation dieser Daten zu berücksichtigen ist. So zeigen die UPR-Konstrukte bereits als Einzelkonstrukt jeweils nur sehr schwache Fluoreszenzen und im Falle einer Kolokalisation ist der beobachtete Unterschied nicht mehr so deutlich wie zuvor. In Kombination mit dem im Regelfall ebenfalls nur sehr schwach exprimierten mRFP, das aufgrund der zur Verfügung stehenden Laser nicht optimal angeregt werden konnte (Anregung: 543 nm, Anregungsmaximum: 567 nm), ergaben sich dadurch Probleme bei der Detektion beider Konstrukte. Eine weitere Schwierigkeit lag in der Detektion authentischer Fluoreszenz nicht in Bezug auf die Signalstärke, sondern auf das detektierte

Fluoreszenzmuster. Eine Kolokalisation von PERK mit Tpt1 scheiterte daran, dass keine Fluoreszenz von Tpt1 detektiert werden konnte, die mit den bisher publizierten Ergebnissen übereinstimmte (Moog et al. 2015). Es konnten nur Expressionsartefakte in Form von Akkumulationen innerhalb der Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte unter anderem durchaus auf PERK selbst zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass die Überexpression eines Faktors der UPR zu ER-Stress führen kann (Imagawa et al. 2008). Sollte dies der Fall sein, so ist die Zelle möglicherweise nicht in der Lage die stark überexprimierten Proteine korrekt zu falten und zu transportieren. Dies könnte eine Begründung für eine generell eher schwache Expression als Einzelkonstrukt sein. Auch die Kolokalisationen könnten von diesem Effekt betroffen sein und das Experiment zusätzlich erschweren. Die Fluoreszenzen der Aquaporine oder auch von Tpt1 im cER zeigen deutlich, dass diese hauptsächlich im NE und cER detektiert werden, wohingegen PERK und IRE1 vermehrt im hER und teilweise im NE zu beobachten sind. Die Kolokalisation von hDer1-2 und den Aquaporinen zeigt ebenfalls, dass hDer1-2 zwar auch im cER und NE zu finden ist, jedoch auch klar die Bereiche markiert, die dem hER zuzuordnen sind. Vergleicht man also nur die Einzelfluoreszenzen, wird eine funktionale Subkompartimentierung des ERs unterstützt. Ob es sich hier um eine vollständige Trennung der einzelnen Bereiche handelt oder sich diese in den Grenzregionen dynamisch wandeln ist nicht abzuschätzen. Die Daten lassen die Vermutung eines Gradienten zu, dessen Mechanismus zur Aufrechterhaltung jedoch noch untersucht werden muss. In Abbildung 17 sind diese Erkenntnisse schematisch dargestellt (s. Abb. 17).

Die Physiologie der Plastide bietet für diese Einteilung des ERs, in ein hER und cER, eine Begründung. Wie bereits erwähnt wird im Verlaufe des Tages eine unterschiedliche Transportleistung für plastidäre Proteine erwartet. Eine große Anzahl von plastidären Proteinen während der Lichtstunden und nur eine geringe Anzahl während der Dunkelheit. Diese Annahme wird unter anderem durch den immerwährenden Reparaturbedarf des Photosystems aufgrund von Lichtschäden unterstützt (Dewez et al. 2009; Shang und Feierabend 1998). Da diese Proteine aufgrund des gegenwärtig geltenden Transportmodells in einem ungefalteten Zustand in die Plastide importiert werden, wird angenommen, dass sich während der Lichtstunden ein hoher Anteil ungefalteter Proteine im cER-Lumen befindet, welcher während der Nachtstunden sinkt (Stork et al. 2012). Daher muss das cER mit einem ständig wechselnden Verhältnis von gefalteten zu ungefalteten Proteinen seine Funktionen aufrechterhalten können. Wäre die UPR auch im cER anzutreffen, würde das während der Lichtstunden eine Reaktion auslösen. Natürlich wäre auch eine entsprechende Gegenmaßnahme im cER möglich, welche die Reaktion der UPR verhindert. Denn eine durch die UPR ausgelöste Reaktion würde einerseits die Proteinfaltung anregen, andererseits jedoch den Import und die Synthese plastidärer Proteine behindern. Beide Reaktionen sind jedoch nicht förderlich für den Transport plastidärer Proteine. Eine Proteinfaltung

ist nicht nötig, da die Proteine bis sie ihren Bestimmungsort erreichen ungefaltet bleiben und eine Faltung somit den Transport inhibieren würde. Der Translationsstop ist ebenfalls hinderlich, da der gesamte Import und damit der Nachschub von zum Beispiel Proteinen der Photosynthese, die sich durch eine hohe Umsatzrate auszeichnen, blockiert wird (Shang und Feierabend 1998). Die Präsenz von hDer1-2 in allen Subkompartimenten des ERs ist einfach zu erklären, da in allen Kompartimenten Proteine beschädigt werden können, die dem Abbau zugeführt werden müssen.

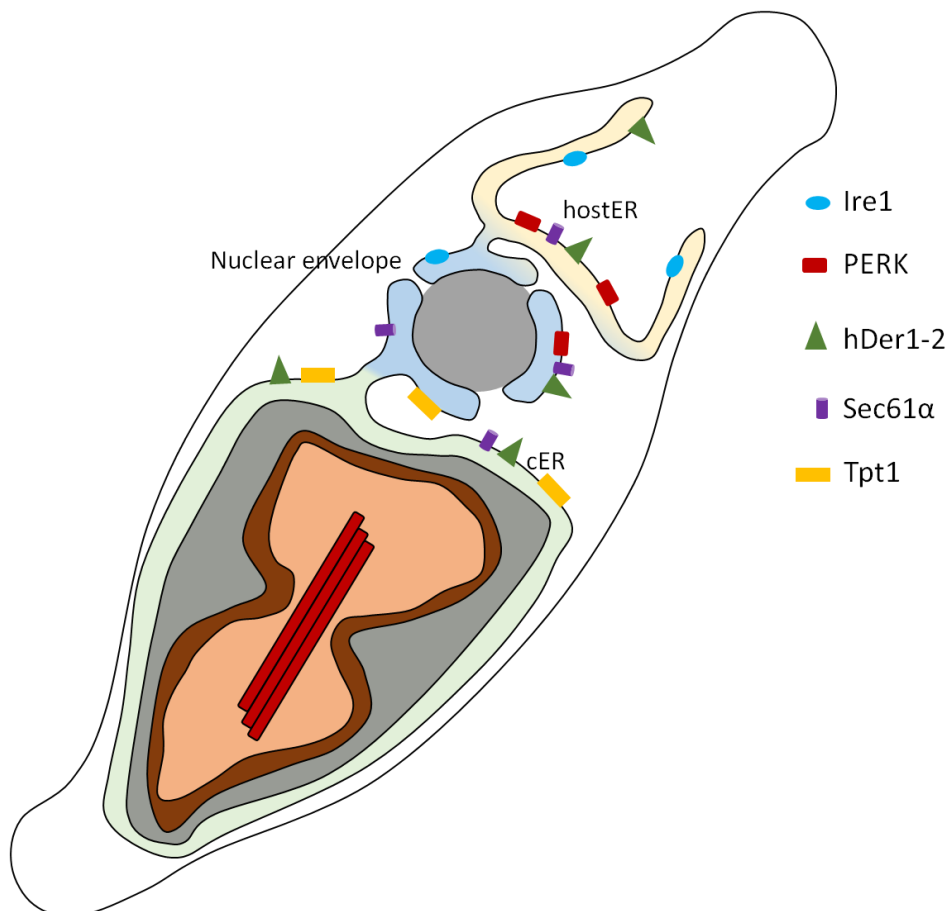


Abbildung 17: Modell der ER-Subkompartimentierung in *P. tricornutum*: Die Abbildung zeigt eine schematische Übersicht von *Phaeodactylum tricornutum*. Die einzelnen Subkompartimente des endoplasmatischen Retikulums sind eingefärbt (grün: cER, blau: nuclear envelope/NE, orange: hostER/hER). Einzelne Komponenten wurden entsprechend ihrer Lokalisation eingezeichnet. IRE1 (blaues Oval) und PERK (rotes Rechteck) werden hauptsächlich im hER und NE detektiert. hDer1-2 (grünes Dreieck) und Sec61α (violetter Zylinder) werden im gesamten ER beobachtet. Transporter wie Tpt1 (gelbes Rechteck) können hauptsächlich im cER und NE detektiert werden.

Eine weitere noch unbeantwortete Frage ist der Mechanismus dieser Subkompartimentierung. Gegenwärtig ist nicht bekannt in welcher Art und Weise die Proteine in das cER oder hER transportiert beziehungsweise dort gehalten werden, obwohl sowohl das hER als auch das cER laut des gegenwärtigen Modells mit dem NE in Verbindung stehen (s. Abb. 17). Eine Möglichkeit besteht darin, dass verschiedene Interaktionspartner dafür sorgen, dass die Proteine nicht in

andere Subkompartimente diffundieren oder auf das jeweilige Subkompartiment beschränkt bleiben. Als Beispiel für diese Erklärung sei das Protein Sec12 genannt, welches durch Interaktionspartner in ER *exit sites* konzentriert wird (Montegna et al. 2012; Saito et al. 2014). Jedoch im Falle einer Überexpression, wenn also der zweite Faktor nicht in ausreichender Menge vorhanden ist, ist die Begrenzung auf diese Subdomäne nicht mehr gegeben. Natürlich wären auch interne Signale in den Proteinen des cERs und hERs möglich, die jedoch noch nicht identifiziert wurden. Weitere Analysen zur Subkompartimentierung sind notwendig, um unter anderem zu überprüfen, ob diese auch auf das ER-Lumen zutrifft und inwiefern das Lumen von hER und cER überhaupt voneinander zu unterscheiden ist.

4.2.2 Evolution der UPR

Zur Aufrechterhaltung der Homöostase des ERs besitzen viele untersuchte Organismen die in der UPR zusammengefassten Signalwege. Dabei können jedoch in einzelnen Gruppen Unterschiede festgestellt werden. In Metazoa finden sich drei Rezeptoren: IRE1, PERK und ATF6 (Hollien 2013; Shen et al. 2002). In Pflanzen können nur Homologe von IRE1 und ATF6 detektiert werden, wohingegen Fungi nur IRE1 aufweisen (Kimmig et al. 2012; Liu et al. 2007; Zhang et al. 2015). Das von IRE1 prozessierte Substrat, ein bZIP Transkriptionsfaktor Hac1/Xbp1/bZIP60, findet sich mit Ausnahme von *S. pombe* in allen untersuchten Organismen, die IRE1 besitzen (Chen und Brandizzi 2013; Kimmig et al. 2012; Zhang et al. 2015). Nach Aktivierung führt IRE1 ein unkonventionelles Spleißen dieses Transkriptionsfaktors durch, was den Faktor aktiviert und die Regulation von Zielgenen bewirkt (Acosta-Alvear et al. 2007; Hooks und Griffiths-Jones 2011; van Anken et al. 2014).

Die Funktion von PERK besteht in der Regulation der Translation. Durch Phosphorylierung von eIF2 α wird die Translation selektiv inhibiert (Harding et al. 2000b; Novoa et al. 2001). In parasitischen Protisten konnten bislang entweder keine klassischen Rezeptoren der UPR oder nur PERK nachgewiesen werden (Moraes et al. 2007; Narasimhan et al. 2008; Santi-Rocca et al. 2012; Spycher et al. 2013). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in Haptophyten und Heterokontophyten sowohl Homologe von IRE1 als auch von PERK gibt (s. Abb. 18).

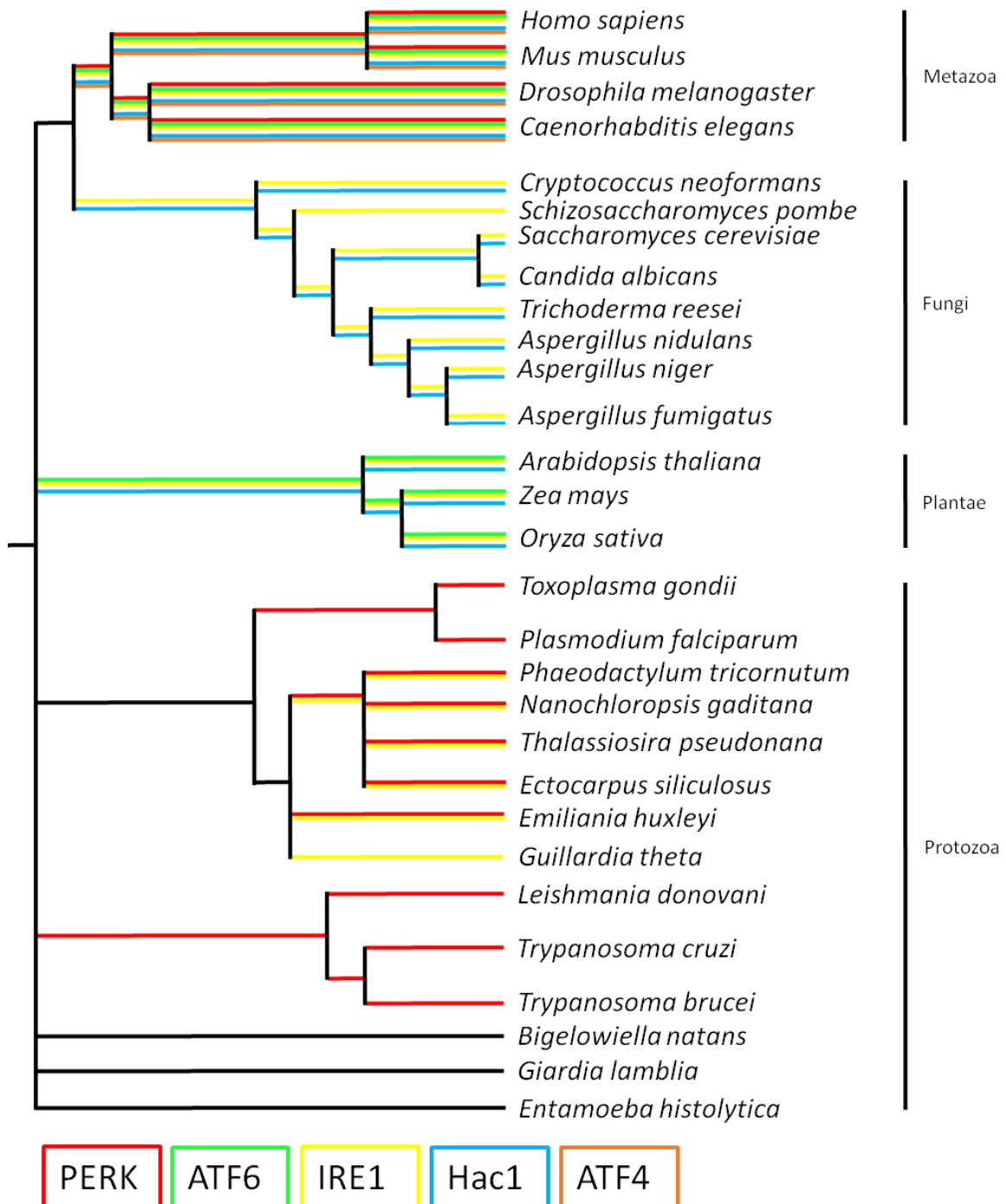


Abbildung 18: Darstellung der Verbreitung der UPR in verschiedenen Organismen: Die Abbildung zeigt ein Baumdiagramm, welches die Verbreitung verschiedener Faktoren der UPR darstellt. Die Farbkodierung ist im unteren Bereich der Abbildung angegeben (PERK: rot, ATF6: grün, IRE1: gelb, Hac1: blau, ATF4: orange). Die Metazoa besitzen einen vollständigen Satz der UPR-Faktoren. In den Fungi können nur IRE1 und Hac1 detektiert werden. *Schizosaccharomyces pombe* bildet eine Ausnahme, da hier kein Homolog zu Hac1 entdeckt wurde. Pflanzen besitzen Homologe zu IRE1 und ATF6, jedoch kein PERK. Die Protisten zeigen ein diverses Verhalten bezüglich der Konservierung von Faktoren der UPR. So besitzen sehr basale, parasitische Protisten wie *G. lamblia* und *E. histolytica* keine Homologe der klassischen UPR (dargestellt durch schwarze Verbindungen). Andere Parasiten wie Trypanosomen und *L. donovani* sowie die Apicomplexa *T. gondii* und *P. falciparum* wiederum scheinen nur ein Homolog von PERK zu besitzen und keine weiteren Rezeptoren der UPR. Die Cryptophyte *G. theta* weist in dieser Analyse nur ein Homolog von IRE1 auf, wohingegen Haptophyten, vertreten durch *E. huxleyi* und Heterokontophyten wie *P. tricornutum*, *N. gaditana*, *T. pseudonana* und *E. siliculosus* sowohl PERK als auch IRE1, jedoch mutmaßlich kein Hac1/Xpb1, besitzen. Auch in Organismen mit komplexen Plastiden chlorophytischen Ursprungs hier vertreten durch *B. natans*, konnte mit IRE1 nur ein Faktor der UPR nachgewiesen werden.

Allerdings zeigen die Protisten kein einheitliches Verhalten hinsichtlich der Zusammensetzung der UPR. In Cryptophyten und Chlorarachniophyten konnte nur ein putatives IRE1 identifiziert werden, jedoch kein PERK. Ein Nachweis von Xbp1/Hac1 oder ATF6 konnte nicht erbracht werden. Dies kann auf die mangelnde Konservierung dieser Faktoren zurückzuführen sein. So war es mit BLAST-Analysen nicht möglich diese Faktoren zu identifizieren. Andererseits ist ATF6 bislang ausschließlich auf Pflanzen und Metazoa beschränkt und möglicherweise nicht existent in Diatomeen (Hayashi et al. 2013; Hollien 2013; Le Sun et al. 2013; Shen et al. 2002). Ein putatives Homolog von ATF6 wurde in *P. tricornutum* identifiziert, jedoch zeigten nachfolgende Studien in der Arbeitsgruppe Maier, dass das entsprechende Genmodell falsch war.

In diesem Zusammenhang sei besonders auf *S. pombe* verwiesen, ein Organismus, der zwar IRE1 besitzt, jedoch kein Homolog von Hac1. Das mutmaßliche Fehlen eines Substrats für IRE1 könnte auch auf eine andere Funktion von IRE1 als das unkonventionelle Spleißen hinweisen. So wurde in neueren Studien gezeigt, dass IRE1 unter anderem im Zusammenspiel mit PERK mRNAs mit einer spezifischen Struktur, welcher der von Hac1/Xbp1 sehr ähnlich ist, degradiert (Hollien und Weissman 2006; Hollien et al. 2009; Moore und Hollien 2015). Dieser als RIDD bezeichnete Mechanismus konnte auch in *S. pombe* nachgewiesen werden (Kimmig et al. 2012). In diesem Fall zeigt IRE1 statt einer transkriptionellen Steigerung der Proteinfaltungskapazitäten eine Verringerung der Proteinlast. Das Beispiel von *S. pombe* zeigt eine Möglichkeit auf, wie die UPR in Diatomeen ablaufen könnte, sollte sich das Fehlen von Xbp1/Hac1 als richtig herausstellen. Gleichzeitig wirft die Präsenz von PERK in einigen basalen Protisten, sowie IRE1 und PERK in Heterokontophyten und Haptophyten, eine weitere Frage hinsichtlich der Evolution der UPR auf. Bislang gilt die Annahme, dass sich IRE1 als ältester Faktor der UPR als erstes entwickelte und daher in vielen Organismen identifiziert werden konnte. Diese Annahme basiert auf der Beobachtung, dass IRE1 in Pilzen, Pflanzen und Metazoa konserviert ist (Mori 2009). PERK und ATF6 entwickelten sich in diesem Szenario erst später. Die Identifizierung von PERK in *T. brucei*, *T. gondii* und *P. falciparum* jedoch stellt diese Annahme infrage (Goldshmidt et al. 2010; Gosline et al. 2011; Moraes et al. 2007; Narasimhan et al. 2008). Tatsächlich konnte in allen diesen Organismen eine translationale Regulation als Reaktion auf ER-Stress nachgewiesen werden. Ein alternatives Szenario der Evolution der UPR wäre also denkbar. Möglicherweise entwickelte sich als erstes PERK und bewirkte einen selektiven Translationsstop, um mit ER-Stress umzugehen. Im Laufe der weiteren Evolution wurde dieser Mechanismus in einigen Linien (Pflanzen und Pilzen) wieder verloren, während IRE1 als weitere Komponente der UPR entstand. Die Funktion von IRE1 war in diesem Fall nicht das unkonventionelle Spleißen eines spezifischen Transkriptionsfaktors, sondern lediglich die Verringerung der ER-lokalisierten mRNAs durch RIDD (Moore und Hollien 2015). Dies würde dem Stadium der UPR in *S. pombe* entsprechen (Kimmig et al. 2012). Später

wurde der Mechanismus schließlich weiterentwickelt und IRE1 erlangte die Fähigkeit, einen spezifischen Transkriptionsfaktor zu spleißen, welcher dann eine Reaktion auf transkriptioneller Ebene einleitete. Das Fehlen von IRE1 in parasitischen Organismen wiederum könnte durchaus mit einer Anpassung an deren Lebensweise erklärt werden.

5. Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien wurden von der Carl Roth GmbH, Merck oder Sigma Aldrich bezogen, sofern nicht anders angegeben. Die Chemikalien wurden den Herstellerangaben entsprechend gelagert und genutzt. Die Zusammensetzung von Puffern und Lösungen wird bei den entsprechenden Methoden angegeben.

Spermidin	AppliChem
Tropic Marin Meersalz	Dr. Biener GmbH
Zeozin	Invivogen

5.1.2 Enzyme

Phusion High Fidelity DNA-Polymerase F-350L (500 U/μl)	Fermentas
Restriktionsendonukleasen (10 U/μl)	Fermentas/NEB
T4-DNA Ligase (5 U/μl)	Fermentas
T5 Exonuclease (10 U/μl)	NEB
Taq DNA Ligase (40 U/μl)	NEB
Taq DNA Polymerase	Biotoools

5.1.3 Molekularbiologische Kits

CloneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas
DNA Clean & Concentrator-5	Zymo Research
HiYield™ DNA Extraction Kit	SLG
NucleoBond™ Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel
Phusion High Fidelity PCR Kit	Fermentas

Q5 High-Fidelity 2x Mastermix	NEB
QIAGEN QIAfilter Midi/Maxi Kit	QIAGEN
Revert Aid Reverse Transkriptase Kit	Fermentas
Zymo Clean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research

5.1.4 Geräte

Zentrifugen:

Centrifuge 5417R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf
Centrifuge 5430R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf
Centrifuge 5810R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf

PCR-Cycler:

Mastercycler gradient	Eppendorf
Mastercycler personal	Eppendorf

Gelelektrophorese:

Bio-Vision Geldokumentationskammer Model 1000	peqlab
Electrophoresis Power Supply EPS 301/601	Amersham Biosciences
Gelkammern verschiedener Größe	Werkstatt der Philipps-Universität
Pharmacia LKB GPS 200/400 Power Supply	Pharmacia Biotech
Pierce Semi Dry Fast Blotter	ThermoScientific
TE 77 Semi-Dry Transfer Unit	Amersham Biosciences

Filter, Membranen, Photomaterialien:

FB30/ 0,2 CA – S Sterilfilter	GE Healthcare
Fuji Medical X-Ray Film 30x40 cm	Fuji
Nitrocellulosemembran	Macherey-Nagel

Röntgenfilmentwickler	Kodak
Röntgenfilmfixierer	Kodak
Whatman Filterpapier 3 mm	Schleicher & Schuell
Sonstige Geräte:	
Bio-Rad Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System	Biorad Laboratories
Exsikkator	Nalgene
GeneQuant 1300 Spectrophotometer	Biochrom
Frenchpress SLM-AMINCO 4-3399	SLM-AMINCO
Klimaschrank MLR 350	Sanyo
Klimakammer	Weiss
KLSM Leica TCS SP2	Leica Microsystems
Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	peqlab
Thermomixer compact	Eppendorf
Thermocycler 60	Biomed
TRM 50 Taumelschüttler	MAGV
Leica DM 6000 B	Leica Microsystems

5.1.5 Organismen

Escherichia coli TOP10: F⁻, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC),

φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, araD139

Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG

Invitrogen

Phaeodactylum tricornutum UTEX 646

Universität von Texas

5.1.6 Vektoren

pJet 1.2 blunt vector

Fermentas

amp^R, P_{T7}, *eco47IR*

pPha-NR

NCBI Acc. JN 180663

amp^R, P_{NR}, T_{NR}, sh ble (Zeozin), ori

pPha-Dual-2xNR

NCBI Acc. JN180664

amp^R, 2x (P_{NR}, T_{NR}), sh ble (Zeozin), ori

5.1.7 Antikörper

Primärantikörper:

α - GFP (goat, Western Blot, 1:3000)	Biomol
α - RbcL (rabbit, Western Blot, 1:7500)	Agrisera
α - PsbD (rabbit, Western Blot, 1:7500)	Agrisera

Sekundärantikörper:

α - goat HRP (1:10000)	Sigma
α - rabbit HRP (1:10000)	Sigma

5.1.8 DNA- und Proteinmolekulargewichtsstandards

Bei der Agarosegelelektrophorese wurden die Standards 100 bp DNA Ladder H3 RTU und 1kb DNA Ladder RTU der Firma Genedirex genutzt. Von den 1:2 verdünnten Lösungen wurden 4 μ l eingesetzt.

Für die Analyse von Proteinen wurde der PageRULER™ Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas verwendet. Es wurden je 4 μ l eingesetzt.

5.1.9 Oligonukleotide

Die Schmelztemperatur wurde mit dem Tm Calculator von ThermoScientific berechnet. Im Falle von Oligonukleotiden, welche im Rahmen der Gibson Assemblierung angewendet wurden, wurde die vorgegebene Annealingtemperatur des NEBuilder™ Assembly Tools gewählt. Restriktions-schnittstellen wurden unterstrichen. Die Oligonukleotide wurden von Sigma Aldrich synthetisiert und auf eine Konzentration von 5 pmol/μl verdünnt.

Name	Sequenz 5' - 3' (Restriktionsschnittstellen gekennzeichnet)
23673_Bam_rv	<u>GGATCC</u> GGATTCTAGAATGGCAAC
23673_Eco_fw	GAATTC <u>ATG</u> AAATTCACATTGCT
30562_Eco_fw	GAATTCATGAAGGCTTCCATTCTG
30562_NcoI_Int_fw	GGCCATGGAAAAGGCTCTCAA
30562_NcoI_Int_rv	GCCTTTTCCATGGCCTTGGT
30562_Xba_rv	TCTAGACGTCAAAGCCGGGAGAAT
33675_Eco_fw	GAATTCATGAAGTATGCTACCCCA
33675_Xba_rv	TCTAGACCGTTTCGACGCGAAAGGA
33911_Bam_rv	<u>GGATCC</u> GGTCAATGGTTGTGACGC
33911_Bam_rv	<u>GGATCC</u> GGTCAATGGTTGTGACGC
33911_Eco_fw	GAATTCATGGCAAAACGAACCGAT
33911_Eco_fw	GAATTCATGGCAAAACGAACCGAT
34389_Eco_fw	GAATTCATGTCGTTTGCAATACGA
34389_Xba_rv	TCTAGAAGAAGATGACACAGACGA
35438_Eco_fw	GAATTCATGCGATTTGCCGGTACT
35438_Xba_rv	TCTAGAGCCTACACACGAATCACA
35593_Eco_fw	GAATTCATGAGACTTCAATCACAC
35593_Xba_rv	TCTAGAAAAGAACGGTGGAGTTCC
37910_Eco_fw	GAATTCATGAATTGCCGCATTGCA
37910_Xba_rv	TCTAGATGATTCACTGTCCCCATT
38354_Eco_fw	GAATTCATGGCGATCACGTCGACC
38354_Int_fw	GGTCACGGTCGAAGTCGTTT
38354_Int_rv	AAACGACTTCGACCGTGACC
38354_Xba_rv	TCTAGACAGACCCGCACAACAGAG
38818_Eco_fw	GAATTCATGAAGTTTGTCTTTGCT
38818_Xba_rv	TCTAGAGGTAAACGGAAGTAGG
39964_Eco_fw	GAATTCATGAAGTTCTCTGCCGTT
39964_Int1_fw	CCTCGGAGTCGGCATCAATA
39964_Int1_rv	TATTGATGCCGACTCCGAGG
39964_Int2_fw	CTCCGGAATGAAGTTTTCCA
39964_Int2_rv	TGGAAACTTCATTCCGGAG
39964_Xba_rv	TCTAGACTTGAGCTGCTTGGAG
40309_Eco_fw	GAATTCATGCGCGGTATCTTCTTC
40309_Int_fw	CCTCTGACGTCCCTTCAGAT

40309_Int_rv	ATCTGAAGGGACGTCAGAGG
40309_Xba_rv	<u>TCTAGAC</u> GAGTTGTCTCCTTGGC
41024_Eco_fw	<u>GAATTC</u> ATGTCGGCATTCAATCTA
41024_Xba_rv	<u>TCTAGAG</u> CCCCAAATACTGCAACTT
41302_Eco_fw	<u>GAATTC</u> ATGGCGCTTTTCCCAAAG
41302_Xba_rv	<u>TCTAGAA</u> ATTTACGACGTACACC
41623_Eco_fw	<u>GAATTC</u> ATGTTCTGTCTCGCTCA
41623_Xba_rv	<u>TCTAGAC</u> AGTTCGTTTTCCGCGTC
42510_Eco_fw	<u>GAATTC</u> ATGGCAGGACTTGAATCT
42510_Xba_rv	<u>TCTAGAA</u> AGCCCATTATCGTTTTT
43598_Bam_rv	<u>GGATCC</u> ATTAAAGCGATTCATGTC
43598_Eco_fw	<u>GAATTC</u> ATGAATTTTACACAATTC
43805_Eco_fw	<u>GAATTC</u> ATGAAATCCTCTTATAAAC
43805_PvuI_Int1_fw	<u>CGATCG</u> ATTTGAAGGCAAAAACCTT
43805_PvuI_Int1_rv	GTTTTTGCCTTCAAAT <u>CGATCG</u>
43805_PstI_Int2_fw	CTTTGGCAGCCCCTGCAGCA
43805_PstI_Int2_rv	ATTTCTGCGAGCGCTGCTGCAGG
43805_PvuI_Int3_fw	GCAAGTGTTTT <u>CGATCG</u> TATGC
43805_PvuI_Int3_rv	CGTGGGCATAC <u>CGATCG</u> AAAACA
43805_Bam_rv	<u>GGATCC</u> AAATCTATTTTGAAAATA
45803_Eco_fw	<u>GAATTC</u> ATGCCGTTCTCTCTACTC
45803_PartI_rv	CTCCTGAAGAGGGTAATTCC
45803_PartII_fw	GGAATTACCCTCTTCAGGAG
45803_Xba_rv2	<u>TCTAGAA</u> AGGCAATCATTTGAGTC
46203_Eco_fw	<u>GAATTC</u> ATGCTTGGGCGTTGGAGC
46203_Int_fw	GTGAAGGGTGAAAAGGCCTT
46203_Int_rv	AAGGCCTTTTCACCCTTCAC
46203_Xba_rv	<u>TCTAGAA</u> ATGCAACTAAATTCTGA
48010_Tom40_Eco_fw	<u>GAATTC</u> ATGGGGACTTCACAATCG
48010_Tom40_Xba_rv	<u>TCTAGAT</u> CCTTCAATTTTAATTCC
48025_Bam_rv	<u>GGATCC</u> TAGACCCAAGTCTTTTTT
48025_Eco_Intern_fw	GTCGAATTCTTGGAGCGCAA
48025_Eco_Intern_rv	GCGCTCCAAGAATTCGACAA
48025_Sac_fw	<u>GAGCTC</u> ATGCATCGATCCCCGTTG
48890_Bam_rv	<u>GGATCC</u> TGTACTGGAATAGTATTC
48890_Eco_fw	<u>GAATTC</u> ATGGGAGAATCAATATCG
48902_Eco_fw	<u>GAATTC</u> ATGTCGGGTGGACCAGCT
48902_Int_fw	CGGATTGCCAATTTTACCA
48902_Int_rv	TGGTAAAAATTGGCAATCCG
48902_Xba_rv	<u>TCTAGAC</u> TTCTTGCTCTTCTTGT
49618_Sac_fw	<u>GAGCTC</u> ATGAGAGTGACAGCTGCA
49618_int_NotI_fw	<u>CGCGGCC</u> GCTCAGAAAGTT
49618_int_NotI_rv	<u>GCGGCC</u> GCGTTAACCACTCTTTTA

49618_Nco_rv	<u>CCATGGATGCAAGAAAATATCGAG</u>
49869_Eco_fw	<u>GAATTCATGAGAGCTTGGCACGTT</u>
49869_Xba_rv	<u>TCTAGAAACAAGAAGCGTTGCCCT</u>
49931_Eco_fw	<u>GAATTCATGAAGTTTCTTTCCGTT</u>
49931_Xba_rv	<u>TCTAGAGGCCATCGCCCCATTTCG</u>
Ire1b_5_EcoRI	<u>GAATTCATGGGGGTACTTCCAACC</u>
Ire1b_3_NcoI	<u>CCATGGCAGTTGTTTTGTTCTTCTCG</u>
Perk_short_5_MunI	<u>CAATTGATGAATCGACGGCAGCGG</u>
Perk_BglII	<u>AGATCTGTGACTCCTCGAGTCGCTAG</u>
GFP_5'_XbaI	<u>TCTAGAATGGTGAGCAAGGGCGAG</u>
GFP_Bam_fw	<u>CGGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC</u>
GFP_HindIII_rv	<u>CTAAGCTTACCTGTACAGCTCGTCCATGC</u>
RFP_3_HindIII	<u>AAGCTTAGGCGCCGGTGGAGTGGCGGCC</u>
RFP_5_XbaI	<u>TCTAGAATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGG</u>
RFP_5_Bam	<u>GGATCCATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGG</u>
Gibson Assembly	
GA_34389_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGTCGTTTGCAATACGAAAC
GA_34389_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAAAGAAGATGACACAGACGAATC
GA_35438_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGCGATTTGCCGGTACTTTAAC
GA_35438_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAGCCTACACACGAATCACAG
GA_35593_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGAGACTTCAATCACACG
GA_35593_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAAAAGAACGGTGGAGTTCC
GA_37910_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGAATTGCCGCATTGCAC
GA_37910_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGATGATTCACTGTCCCATTC
GA_38354_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGGCGATCACGTCGACC
GA_38354_rv2	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGACAGACCCGCACAACAGAG
GA_38818_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGAAGTTTGTCTTTGCTC
GA_38818_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAGGTAAACGGACTAGTAGG
GA_39964_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGAAGTTCTCTGCCGTTATTC
GA_39964_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGACTTGAGCTGCTCTTGAG
GA_40309_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGCGCGGTATCTTCTTC
GA_40309_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGACGGAGTTGTCTCCTTGGC
GA_41024_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGTCGGCATTCAATCTAG
GA_41024_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAGCCCAAATACTGCAACTTTTTTG
GA_41302_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGGCGCTTTCCCAAAG
GA_41302_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAAATTTACGACGTACACC
GA_44488_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGAAGATTCTCTCGTCTC
GA_44488_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAGAAAAACAAGACGAGCAAAC
GA_46203_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGCTTGGGCGTTGGAGC
GA_46203_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAAATGCAACTAAATTCTGATGGTGATCC
GA_48010_Tom40_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGGGGACTTCACAATCG
GA_48010_Tom40_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGATCCTTCAATTTAATCCGTATC
GA_49699_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGTTTCCGTCCGGCTCAG

GA_49699_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAGTGGTAGAGCATTTGAC
GA_49869_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGAGAGCTTGGCACGTTTC
GA_49869_rv	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTAGAAACAAGAAGCGTTGCCCTTTC
GA_eGFP_SpeSac_rv	AGTCTTAAAGTAAATTCCGCGGTTACCTGTACAGCTCGTC
GA_Ire1_SpeSac_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGACTAGTATGGGGGTACTTCCAACC
GA_PERKGFP_SpeSac_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGACTAGTATGAATCGACGGCAGCGG
PERK_GA_fw	CACTTGTGCGAACGGAATTCATGAATCGACGGCAGCGG
PERK_GA_rv	TCGGAGGAGGCCATTCTAGAGTGACTCCTCGAGTCGCTAG
GA_Tip3_Spe_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGACTAGTATGGTTGAGTACGGTGAG
GA_Tip5_Spe_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGACTAGTATGGTCAAGGACTACGTC
GA_Tpt3_EcoHind_fw	GTCACCACTTGTGCGAACGGAATTCATGAGTTCCTCGACTGCGAAAG
GA_hDer1-2_EcoXba_fw	CACTTGTGCGAACGGAATTCATGCCGTTTGCTCAACCAG
GA_hDer1-2_EcoXba_rv	TCGGAGGAGGCCATTCTAGAATCTCGTCCCAAAGGGCG
GA_mRFP_3'	CTAGTCTTAAAGTAAATTGAAGCTTAGGCGCCGGTGGAGTG
Sequenzierungen	
30562_seq_rv	CCACGCATACGGGCGGCAATTT
35438_seq_fw	GGGTGGAGCAAATCGTGCTT
38354_seq_fw	GCGCGTGAGCAATTTGTAA
39964_I_seq_fw	CCCACCGAGCACCTTCTATT
39964_II_seq_fw	CGAACCTTTTTGGCTACGCA
40309_seq_fw	CCGATATCGATTGCGAAA
41302_seq_fw	CGGAGCAGCAAGTTGCAGAT
43598_seq_fw	GCCTCTCTACTACAAACA
45803_seq_fw_I	CTACAGTACAATGATACTCAAGCA
45803_seq_fw_II	GCCGAACCAGAAACAACAT
45803_seq_rv_I	GGGAGATAGTGTGCACCTCTTT
46203_seq_fw	CCTCTACAACACCGGGCATT
48902_seq_fw	GGAACGGACAAGACCAGG
GFP 5' raus	TGAACTTGTGGCCGTTTACGT
Ire_5'_seq_fw	CGAGAGAGTCAATCGTTTT
Ire_5'_seq2_fw	GGACGAGGTTCTAAACAA
Ire_5'_seq3_fw	GGCGATTTGTTTACCTT
mRFP_5'raus	AGGGCAGGGGGCCGCCCTTGGTCACCTTCA
PERK_seq_fw	CGGTAACACAGTATGTAGATT
PERK_seq_rv	GCAAAGCTGCATTTGAATAT
pJet1.2_fw	GCACAAGTGTTAAAGCAGTT
pJet1.2_rv	CTCTCAAGATTTTCAGGCTGTAT
pPha_5'vorNdeI	GCTTAACTATGCGGCATCAG
pPhaDual_MCS_EcoHind_fw	GGACATATTGTCGTTAGAACGCGG
pPhaDual_MCS_EcoHind_rv	GTCTTATCCAGGTCCAAACAGATTG
pPhaDual_MCS_SpeSac_rv	CTAACGCAGCTTAGACATAAAC
pPhaNR_fw	GGTCGGGTTTCGGATCCTTCC
pPhaNR_rv	GATGAACATAAAACGACGATGAG

5.1.10 Software- und Internetanwendungen

Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programm Sequencher 5.1 der Firma Gene Codes bearbeitet.

Für die Bearbeitung von Fluoreszenzbildern wurden die Programme ImageJ sowie LCS lite der Firma Leica Microsystems verwendet.

Internetanwendungen:

BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
PhatrDBv2.0	http://genome.jgi.doe.gov/Phatr2/Phatr2.home.html
ChloroP 1.1 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/
<i>Guillardia theta</i> CCMP2712 v1.0	http://genome.jgi-psf.org/Guith1/Guith1.home.html
<i>Saccharomyces</i> Genome Database	http://www.yeastgenome.org/
SignalP 3.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/
SignalP 4.1 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
TargetP 1.1 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/
ThapsDBv3.0	http://genome.jgi-psf.org/Thaps3/
Tm Calculator	http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/
TOPCONS	http://topcons.cbr.su.se/
<i>Emilania huxleyi</i> Genome Database	http://genome.jgi.doe.gov/Emihu1/Emihu1.home.html
<i>Ectocarpus siliculosus</i> Genome V2	http://bioinformatics.psb.ugent.be/orcae/overview/EctsiV2
<i>Nanochloropsis gaditana</i> Genome	http://www.nanochloropsis.org/tool/gbrowse
BOCTOPUS2	http://boctopus.cbr.su.se/
BOMP	http://services.cbu.uib.no/tools/bomp
MCMBB	http://athina.biol.uoa.gr/bioinformatics/mcmbb/

Pred-TMBB	http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/input.jsp
Pred-TMBB2	http://www.compgen.org/tools/PRED-TMBB2
TMBETADISC-RBF	https://rbf.bioinfo.tw/~sachen/OMPpredict/TMBETADISC-RBF.php
Phyre2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/ page.cgi?id=index
TMHMM v. 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
Philius	http://www.yeastrc.org/philius/pages/philius/ runPhilius.jsp
Phobius	http://phobius.sbc.su.se/index.html

5.2 Methoden

5.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli* TOP10

Die Kultivierung von *E. coli* TOP10 Zellen (Invitrogen) erfolgte entweder auf Fest- oder in Flüssigmedium unter Zusatz des Selektionsmarkers Ampicillin in der Endkonzentration 50 µg/ml bei 37 °C. Die Kryokonservierung positiver Klone erfolgte in Flüssigmedium, welches zu gleichen Teilen mit Glycerin vermischt wurde, bei -80 °C.

LB-Medium:

Bacto-Trypton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)
Agar-Agar (Festmedium)	1,3 % (w/v)
LB Amp 50	50 µg/ml
LB Kan 25	25 µg/ml

5.2.2 Kultivierung von *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 646

P. tricornutum Kulturen wurden bei 22 °C und Dauerlicht (8.000 – 10.000 Lux) in f/2-Medium kultiviert. Die Zellen wurden entweder in Flüssigmedium bei 150 rpm schüttelnd inkubiert oder auf Platten, denen 1,5 % Agar zugesetzt wurde. Als Selektionsmarker und für die Stammhaltung wurde Zeozin in einer Konzentration von 75 µg/ml eingesetzt. Die Kryokonservierung erfolgte in der stationären Phase, dazu wurden 50 ml einer Kultur geerntet und in 1,7 ml Medium sowie 25 µg/ml Kanamycin, 75 µg/ml Zeozin und 5 % Glycerin resuspendiert. Die Kultur wurde in Cryotube™ Vials (ThermoScientific) transferiert. Die Proben wurden in einer auf Raumtemperatur adaptierten CoolCell (Biocision) bei -80 °C für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Proben in Aufbewahrungsboxen überführt und bei -80 °C gelagert.

Das Medium wurde nur zur Induktion mit NaNO₃ angesetzt. Die Stammhaltung und Kultivierung erfolgte in Medium mit NH₄Cl. Vitamine und Spurenelemente wurden steril filtriert und erst nach dem Autoklavieren zugesetzt.

f/2 Flüssigmedium:

Tropic marine	1,66 % (w/v)
NaNO ₃ bzw. NH ₄ Cl	0,89 mM bzw. 1,5 mM
NaH ₂ PO ₄	36 µM
Tris (pH 8,0)	2 mM
f/2 Vitamine	1:1000
f/2 Spurenelemente	1:1000

f/2 Spurenelemente:

FeCl ₃	11,65 mM
Na ₂ EDTA	11,71 mM
CuSO ₄	36 µM
ZnSO ₄	77 µM
CoCl ₂	42 µM
MnCl ₂	910 µM
Na ₂ MoO ₄	26 µM

f/2 Vitaminlösung:

Biotin	2 µM
Cyanocobalmin	0,37 µM
Thiamin-HCl	297 µM

5.2.3 Analyse und Modifikation von Nukleinsäuren**5.2.3.1 Isolation von Gesamt-DNA und -RNA aus *Phaeodactylum tricornutum***

Die Isolation von Gesamt-DNA (gDNA) erfolgte nach der CTAB-Methode (Doyle und Doyle, 1990). Die Isolation von Gesamt-RNA (gRNA) erfolgte nach dem NAES-Protokoll. Für beide Methoden wurden 150 ml einer Algenkultur verwendet.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT) pelletiert (2.500 x g, 10 Minuten). Nach einer Resuspension in 3 ml NAES wurden die Proben zu je 500 µl aliquotiert und mit 500 µl Aqua-Phenol gemischt. Nach Zusatz von 100 mg Glasperlen wurden die Proben mehrmals für 30 Sekunden gevortext und anschließend zentrifugiert (20.000 x g, 15 Minuten, RT). Der wässrige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1x Volumen PCI gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation (20.000 x g, 15 Minuten, RT) wurde der Überstand abermals überführt und mit 1x Volumen Chloroform gemischt. Die Zentrifugation wurde wiederholt und der Überstand mit eiskaltem absolutem Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Die Fällung erfolgte mittels Zentrifugation (20.000 x g, 15 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit Ethanol (70 %) gewaschen und wie zuvor erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die RNA bei Raumtemperatur getrocknet und in 20 µl ddH₂O resuspendiert.

NAES:

NaCH ₃ COO (pH 5,1)	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	1 % (w/v)

5.2.3.2 DNaseI-Behandlung und reverse Transkription (RT-PCR)

Die isolierte gRNA wurde einer DNaseI-Behandlung unterzogen, um mögliche DNA-Kontaminationen zu entfernen. Es wurde nach den Herstellerangaben der Firma Fermentas vorgegangen und 1 µg gRNA eingesetzt.

Die Umwandlung von gRNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mittels des Revert Aid Reverse Transkriptase Kits der Firma Fermentas nach Herstellerangaben mit Random-Hexamer-Primern. Es wurden 500 ng der behandelten RNA eingesetzt.

5.2.3.3 Amplifikation von Nukleinsäuren – Polymerasekettenreaktion (PCR)

Nukleinsäuren wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert (Mullis et al. 1986). Es wurde entweder das Phusion High Fidelity PCR Kit der Firma Fermentas oder aber der Q5 High Fidelity 2x Mastermix nach Herstellerangaben verwendet. Das PCR-Programm wurde nach Herstellerangaben programmiert. Annealingtemperatur und Elongationszeit wurden dem PCR-Produkt und den eingesetzten Primern angepasst. 100 – 150 ng gDNA bzw. 1,5 µl cDNA wurden als *template* eingesetzt. Im Falle des Phusion High Fidelity PCR Kits wurde zusätzlich 1 µl 50 mM MgCl₂ in einen 25 µl Reaktionsansatz zugesetzt.

Im Falle einer Kolonie PCR, einer Amplifikation von DNA-Fragmenten aus transformierten *P. tricornutum* Klonen, wurde überprüft, ob das transformierte DNA-Fragment ins Genom integriert wurde. Dazu wurde ein Teil der Kolonie in 50 µl ddH₂O resuspendiert und 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10.000 x g, 5 Minuten, RT) wurden 5 µl des Überstands in der PCR eingesetzt. Für die Kolonie PCR wurde ausschließlich die Taq-Polymerase der Firma Biotools eingesetzt. Auch hier folgte das Programm den Herstellerangaben und Annealingtemperatur sowie Elongationszeit wurden angepasst.

5.2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese und Elution

Die Auftrennung der DNA erfolgte auf TBE-Agarosegelen in 1x TBE Puffer nach Sambrook bei konstanter Spannung von 150 bis 180 V (Sambrook et al. 1989). Die Stärke des Agarosegels wurde abhängig von der Fragmentgröße gewählt und lag zwischen 0,6 – 2 %. Den Gelen wurde 0,003 % (v/v) RotiSAFE zugesetzt, um die DNA auf einem UV-Schirm sichtbar zu machen.

Die Elution von DNA-Fragmenten wurde entweder mit dem HiYield DNA Extraction Kit (SLG), dem DNA Clean & Concentrator-5 Kit (Zymo Research) oder dem Zymo Clean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Resuspension der DNA erfolgte in 10 µl ddH₂O.

10 x TBE Puffer:

Borsäure	1 M
Tris	0,83 M
Na ₂ EDTA	10 mM
RotiSAFE	0,003 % (v/v)

DNA-Probenpuffer:

Harnstoff	4 M
Saccharose	50 % (w/v)
Na ₂ EDTA	50 mM
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
Xylencyanol	0,1 % (w/v)

5.2.3.5 Restriktion von Nukleinsäuren

Die Restriktion von DNA erfolgte mit spezifischen Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas oder NEB. Ein Restriktionsansatz enthielt eine an die Probenkonzentration angepasste DNA-Menge, Restriktionsenzyme und einen spezifischen Restriktionspuffer oder 1x SDB. Das Endvolumen betrug 10 µl und wurde mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Überprüfung und Aufreinigung erfolgte wie im vorherigen Abschnitt angegeben.

1x SDB Puffer:

Tris/Acetat (pH 7,0)	30 mM
KCH ₃ COO	50 mM
Mg(CH ₃ COO) ₂	10 mM
Spermidin	4,9 mM
DTT	5 mM

5.2.3.6 Ligation und Gibson Assembly

Die Ligation von DNA-Fragmenten in pJet1.2 wurde mittels des CloneJET PCR Cloning Kits (Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt. Ligationen von DNA-Fragmenten mit komplementären Zielvektoren (pPha_NR, pPha_DUAL_2xNR), welche durch Restriktion generiert wurden, erfolgte unter Verwendung der T4-Ligase nach Herstellerangaben in einem 10 µl Reaktionsansatz mit dem 10x T4-Ligase-Puffer.

Die Gibsonreaktion wurde nach dem Protokoll von Gibson et al. durchgeführt (Gibson et al. 2009; Gibson et al. 2010). Der Reaktionsmix wurde dabei aus den einzelnen Komponenten selbst angesetzt.

5x Isothermaler Mastermix:	Konzentration Stammlösung	
Tris-HCl (pH 7.5)	1 M	3 ml
MgCl ₂	1 M	300 µl
dGTP	100 mM	60 µl
dATP	100 mM	60 µl
dTTP	100 mM	60 µl
dCTP	100 mM	60 µl
DTT	1 M	300 µl
NAD	10 mM	300 µl
PEG-8000		1,5 g

Gibson Reaktionsmix:

5x Isothermaler Mastermix	320 µl
T5 Exonuclease (10 U/µl)	0,64 µl
Phusion DNA Polymerase (2 U/µl)	20 µl
Taq DNA Ligase (40 U/µl)	0,16 µl
ddH ₂ O	860 µl

Der Gibson Reaktionsmix wurde zu je 15 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Das Endvolumen der Reaktion betrug 20 µl, welches durch Zugabe der DNA-Fragmente und ddH₂O erreicht wurde. In der Reaktion betrug das Verhältnis von Insert zu Vektor 3:1. Es wurden 100 ng des aufgereinigten Vektors eingesetzt und entsprechend der Größe der Inserts, wurde die entsprechende Menge errechnet. Die Inserts wurden durch PCR mit speziellen Primern amplifiziert, welche 5' und 3' des Inserts einen Überhang von etwa 20 Nukleotiden in den Vektor generierten. Diese Primer wurden mit dem NEBuilder Assembly Tool (NEB) abgeleitet. Der Ansatz

wurde eine Stunde bei 50 °C inkubiert und anschließend in RbCl₂-kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert.

5.2.3.7 Transformation von RbCl₂-kompetenten *Escherichia coli* TOP10-Zellen

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurden diese in chemisch kompetente Zellen eingebracht. 50 µl RbCl₂-kompetenter *E. coli* TOP10-Zellen (Invitrogen) wurden auf Eis aufgetaut und mit dem Ligations- oder Gibsonreaktionsansatz gemischt und auf Eis für 10 – 30 Minuten inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 – 90 Sekunden bei 42 °C im Thermocycler wurde der Ansatz erneut für 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend auf LB-Agarplatten mit Selektionsmarker ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien wurde eine einzelne Kolonie der TOP10-Zellen über Nacht bei 37 °C in 50 ml LB-Medium inkubiert. 3 Liter LB-Medium wurden dann mit dieser Vorkultur auf eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,1 angeimpft. Dem Medium wurden MgSO₄ und MgCl₂ in einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt und die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 schüttelnd inkubiert. Nach Erreichen der entsprechenden optischen Dichte wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis gelagert und anschließend pelletiert (6.000 x g, 10 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150 ml RF1-Puffer resuspendiert, erneut auf Eis für 30 Minuten inkubiert und wie zuvor pelletiert. Die Zellen wurden in 150 ml RF2-Puffer resuspendiert und nochmals auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C zu je 100 µl in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C gelagert.

RF1-Puffer:

RbCl ₂	100 mM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	50 mM
KCH ₃ COO	30 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mM
Glycerin	15 % (w/v)

RF2-Puffer:

MOPS	10 mM
RbCl ₂	10 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	75 mM
Glycerin	15 % (w/v)

Beide Puffer wurden auf einen pH von 5,8 eingestellt. Im Falle des RF1-Puffers wurde 0,2 M Essigsäure und NaOH im Falle des RF2-Puffers verwendet. Danach wurden beide Puffer steril filtriert.

5.2.3.8 Plasmidisolierung aus *Escherichia coli* mittels alkalischer Lyse

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* erfolgte mittels alkalischer Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly 1979). 1,5 ml einer über Nacht inkubierten Bakterienkultur wurden bei 20.000 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 150 µl P1-Puffer resuspendiert und anschließend mit 200 µl P2-Puffer gemischt. Nach einer Inkubation bei RT für nicht mehr als 5 Minuten wurden 200 µl P3-Puffer, sowie 20 µl Chloroform hinzugegeben und das Gemisch stark geschüttelt. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation (20.000 x g, 4 °C, 5 Minuten). Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 0,7x Volumen Isopropanol versetzt und gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation (20.000 x g, 20 Minuten, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert (20.000 x g, 5 Minuten, 4 °C), der Überstand verworfen und die DNA bei 50 °C getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 50 µl ddH₂O resuspendiert.

P1-Puffer:		P2-Puffer:		P3-Puffer:	
Tris/HCl (pH 8,0)	50 mM	NaOH	200 mM	KCH ₃ COO (pH 5,5)	3 M
EDTA	10 mM	SDS	1 % (w/v)		
RNase A	100 µg/ml				

Der pH des P3-Puffers wurde mit Essigsäure auf 5,5 eingestellt.

Für einige Anwendungen, wie die biolistische Transformation von *P. tricornutum*, wurden größere und reinere Mengen von DNA benötigt. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid aus einer 50 ml *E. coli* TOP10-Übernachtskultur entweder mit dem QIAfilter Midi/Maxi Kit (QIAGEN) oder dem NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

5.2.3.9 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung der generierten Plasmide erfolgte durch die Firma Macrogen nach deren Angaben (EZ-Seq). Hierzu wurden 500 ng eines Plasmids mit 5 µl eines Primers (5 pmol/µl) gemischt, auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und eingeschickt.

5.2.3.10 Biolistische Transfektion von *Phaeodactylum tricornutum*

Die generierten Fusionskonstrukte wurden zur homologen Expression in *P. tricornutum* mittels biolistischer Transfektion eingebracht (Apt et al. 1996; Zaslavskaja et al. 2000). Hierfür wurden die mittels PCR amplifizierten und über Ligation oder Gibson Assembly mit dem Reporter eGFP fusionierten Konstrukte in die Expressionsvektoren pPha_NR oder pPha_DUAL_2xNR eingebracht.

Zur Vorbereitung der Microcarrier wurden 60 mg M10 Wolfram-Partikel (0,7 µm) der Firma Biorad abgewogen. Die Partikel wurden mit 1 ml absolutem Ethanol (HPLC-Qualität) versetzt und 5 Minuten durch einen Vortexer gemischt. Nach einer Zentrifugation (20.000 x g, RT) wurden die Partikel zweimal mit 1 ml sterilem ddH₂O gewaschen. Danach wurden die Microcarrier in 1 ml ddH₂O resuspendiert, in 50 µl Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C gelagert.

Für die biolistische Transfektion wurde eine etwa 7 Tage alte *P. tricornutum* Kultur eingesetzt. Die Zellzahl wurde mittels einer Thoma-Zählkammer bestimmt (Gesamtzellzahl = Ø Zellen pro Kleinquadrat x 4 x 10⁶ x Kulturvolumen). Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (1.500 x g, 5 Minuten, RT) und mit f/2-Medium auf eine Zellzahl von 1 x 10⁹ Zellen pro ml eingestellt. Je 100 µl (10⁸ Zellen) wurden dann auf f/2 Platten ohne Selektionsmarker mittig mit einem Durchmesser von etwa 5 Zentimetern ausplattiert und für eine Stunde getrocknet.

Die Bindung der Plasmid-DNA an die Wolfram-Partikel erfolgte unmittelbar vor der Transfektion. Hierzu wurden 50 µl der Partikel, 5 µg der Plasmid-DNA, 50 µl 2,5 M CaCl₂ und 20 µl 0,1 M Spermidin gemischt und für 60 Sekunden gevortext. Es folgte eine Sedimentation für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die Partikel mit 200 µl absolutem Ethanol (HPLC-Qualität) versetzt. Nach erneuter Sedimentation für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und die Partikel in 50 µl absolutem Ethanol (HPLC-Qualität) resuspendiert. Die Partikel wurden umgehend für die Transfektion eingesetzt.

Die biolistische Transfektion wurde mittels des Bio-Rad Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery Systems durchgeführt. Zunächst wurden alle Bestandteile und der Innenraum dieses Geräts mit absolutem Ethanol (HPLC-Qualität) gereinigt. Für jedes Konstrukt wurden 3 Transfektionen durchgeführt. Dazu wurden 10 µl der mit der DNA-gekoppelten Microcarrier auf den Macrocarriern aufgebracht und getrocknet. Eine *rupture disc* (1350 oder 1550 psi) wurde in den oberen Teil der Apparatur eingesetzt. Anschließend folgte der Zusammenbau von Macrocarrier, *Stopping Screen* und Halterung, welche dann in der obersten Position des Innenraums eingesetzt wurde. Während der Transfektion wurde ein Vakuum von -25 psi im Innenraum aufgebaut und die Zellen mit Helium bei einem Druck, welcher durch die eingesetzte *rupture disc* vorgegeben wurde, beschossen. Die Platten wurden dann mit Parafilm versiegelt und für 24 Stunden bei

Dauerlicht (8.000 – 10.000 Lux) bei 22 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml f/2-Medium abgeschwemmt und auf drei Zeozin-haltige Platten (75 µg/ml) zur Selektion aufgeteilt. Nach weiterer Inkubation für zwei bis drei Wochen konnten die Kolonien für weitere Analysen oder die Stammhaltung überimpft werden.

5.2.4 Proteinanalytik

5.2.4.1 Zellfraktionierung, Carbonatextraktion und TCA-Fällung

Zur Überprüfung der Membranintegration von Proteinen wurde eine Zellfraktionierung mit anschließender Carbonatextraktion durchgeführt. In 50 ml einer *P. tricornutum* Kultur wurde die Expression des Fusionskonstrukts für 8 bis 24 Stunden induziert. Die Zellen wurden pelletiert (1.500 x g, 5 Minuten, RT), mit PBS gewaschen und in 2,8 ml Solubilisierungspuffer A (SolA) resuspendiert. Dem Puffer wurde ein Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1:200) sowie PMSF (1 mM) zugesetzt. Nach der Resuspension wurden die Proben auf Eis gelagert. Die Zellen wurden mit einer Frenchpress (Aminco) aufgeschlossen (1.000 psi, 1 Passage). Intakte Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (1.500 x g, 10 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde für die Carbonatextraktion verwendet. Durch Ultrazentrifugation (120.000 x g, SW 60Ti Ausschwingrotor, L7-55 Beckmann Ultrazentrifuge, 60 Minuten, 4 °C) wurden die Membranen pelletiert. Der Überstand, welcher die löslichen Proteine enthält, wurde vollständig abgenommen und das Pellet in Carbonatpuffer (pH 11,5) resuspendiert und auf Eis 30 Minuten inkubiert. Auch hier wurde nochmals PIC und PMSF hinzugefügt. Nach erneuter Ultrazentrifugation wie zuvor, wurde der Überstand, welcher die Membran-assoziierten Proteine enthält abgenommen und das Pellet, welches nun nur noch Membranproteine enthält, in 1 ml SolA aufgenommen. Gleiche Mengen aller drei Fraktionen wurden mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) gefällt.

Nach Zugabe von TCA wurden die Proben mehrfach kräftig gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20.000 x g, 30 Minuten, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mehrfach mit 1 ml eiskaltem 80 % Aceton gewaschen. Nach der Trocknung des Pellets wurde dieses in Harnstoffpuffer resuspendiert und bei 60 °C für 20 Minuten schüttelnd inkubiert. Nach Zentrifugation (10.000 x g, 5 Minuten, RT) wurde der Überstand in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei – 20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Harnstoffpuffer:

Urea	8 M
Tris/HCl	200 mM
EDTA	0,1 mM
SDS	5 % (w/v)
Bromphenolblau	0,03 % (w/v)
β -Mercaptoethanol	1 % (v/v)

Solubilisierungspuffer A (SolA):

NaCl	50 mM
Imidazol/HCl (pH 7,0)	50 mM
6-Aminocaprinsäure	2 mM
EDTA	1 mM
Sucrose	8,5 % (w/v)

Carbonatpuffer:

NaHCO ₃ (pH 11,5)	100 mM
------------------------------	--------

PBS (pH 7,4):

NaCl	140 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

Protease Inhibitor Cocktail (PIC):

Hepes/KOH (pH 7,0)	1 M
Aprotinin	200 µg/ml
Chymostatin	200 µg/ml
Antipain	200 µg/ml
Elastatinal	200 µg/ml
Leupeptin	200 µg/ml
Pepstatin A	200 µg/ml
Trypsin-Inhibitor	200 µg/ml
Na ₂ EDTA	200 µg/ml

5.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz

Die Proteinkonzentration wurde mittels Amidoschwarz 10 B bestimmt. Sie erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Schaffner und Weissmann (Schaffner und Weissmann 1973). 2 bis 5 µl der Proteinlösung wurden mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit 400 µl Amidoschwarz-Färbelösung gemischt. Nach Zentrifugation (20.000 x g, 15 Minuten, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl Amidoschwarz-Waschlösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (20.000 x g, 15 Minuten, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Es folgte eine Resuspension in 1 ml 200 mM NaOH und die Bestimmung der Absorption bei 615 nm. Anhand einer BSA Eichgeraden konnte daraus die Proteinkonzentration ermittelt werden.

Amidoschwarz-Färbelösung:

Methanol	90 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Amidoschwarz 10B	0,01 % (w/v)

Amidoschwarz-Waschlösung:

Methanol	90 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

5.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt (Laemmli 1970). Die Acrylamidkonzentration der eingesetzten SDS-Gele wurde an die zu erwarteten Molekulargewichte der Proben angepasst und betrug 8,5 - 12,5 %. Zur Herstellung der Gele wurde das Rotiporese Gel 30 (Roth) eingesetzt, welches eine Mischung aus Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 30:8 enthält. Für den Gellauf wurden eine Spannung von 150 V und eine Stromstärke von 30 mA eingestellt. Es wurden 4 µl des PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) Massenstandards aufgetragen.

4 x Trenngelpuffer:

Tris/HCl (pH 8,8)	1,5 mM
SDS	0,4 % (w/v)

4 x Sammelgelpuffer:

Tris/HCl (pH 6,8)	500 mM
SDS	0,4 % (w/v)

10x SDS Laufpuffer:

Tris	250 mM
Glycin	2 M
SDS	1 % (w/v)

5.2.4.4 Western Blot und Immunodetektion

Um die Proteine anschließend durch Immunodetektion nachzuweisen, wurden diese nach der Auftrennung auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Towbin et al. 1979). Dabei wurden das SDS-Gel, Whatman-Papier und die Nitrocellulosemembran in Transferpuffer äquilibriert. Zum Blotten wurde entweder das TE 77 Semi-dry Transfer-System (Amersham Biosciences) oder der Pierce Semi Dry Fast Blotter (ThermoScientific) verwendet. Der Zusammenbau des Blots erfolgte luftblasenfrei. Auf drei Lagen des Whatman-Papiers folgten die Nitrocellulosemembran, das SDS-Gel und erneut drei Lagen Whatman-Papier. Bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² und einer Spannung von 50 V wurde der Transfer 70 Minuten lang durchgeführt. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran für eine Stunde auf einem Taumelschüttler in Blockingreagenz inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Anschließend wurde das Blockingreagenz ausgetauscht und der Primärantikörper hinzugegeben. Die Inkubation mit diesem Antikörper wurde entweder über Nacht bei 4 °C oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurde die

Membran dreimal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membran wurde erneut zweimal in TBS-T, einmal in TBS und einmal in ddH₂O gewaschen. Danach wurde der mit HRP-gekoppelte Sekundärantikörper mit ECL (*enhanced chemiluminescence*) detektiert. Die Membran wurde 5 Minuten in ECL inkubiert und anschließend erfolgte die Detektion mittels Röntgenfilms in der Dunkelkammer.

Transferpuffer:

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)

Blockingreagenz:

Magermilchpulver in TBS-T	5 % (w/v)
---------------------------	-----------

TBS-T:

Tris/HCl (pH 7,5)	100 mM
NaCl	150 mM
Tween20	0,1 % (v/w)

TBS:

Tris/HCl (pH 7,5)	100 mM
NaCl	150 mM

ECL-Lösung:

Luminol in DMSO	5 mM
Coumaric Acid in DMSO	0,8 mM
Tris/HCl (pH 8,5)	200 mM
H ₂ O ₂ (30 %)	1:1000

Das Wasserstoffperoxid wurde erst kurz vor Gebrauch der ECL-Lösung hinzugefügt.

5.2.5 *In vivo* Lokalisationsstudien

5.2.5.1 Lokalisationsstudien von eGFP- und mRFP-Fusionsproteinen

Die Analyse der Lokalisation von Proteinen erfolgte mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie, kurz KLSM (s. Kapitel 6.2.5.4). Abhängig von den verfügbaren EST-Daten wurden die Konstrukte entweder von genomischer DNA oder von cDNA amplifiziert. Für die klassische Restriktionsklonierung wurden entsprechende Schnittstellen eingefügt. Die Sequenzen wurden mit einem C-terminalen eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) oder einem mRFP (*monomeric red fluorescent protein*) fusioniert. Der Endvektor war entweder pPha_NR oder pPha_DUAL_2xNR. Die Schnittstellen sind in den entsprechenden Primern kenntlich gemacht (s. Kapitel 6.1.9). Nach erfolgter biolistischer Transfektion wurde die Expression durch Inkubation auf Nitrat-haltigen f/2-Platten (0,89 mM NaNO₃) für zwei bis drei Tage induziert.

5.2.5.2 4', 6-Diamidino-2-Phenylindol-Färbung von Nukleinsäuren

Zuvor induzierte Zellen wurden zur Überprüfung einer möglichen Lokalisation im Zellkern mit 4', 6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Roth GmbH) angefärbt. Dazu wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen (2.000 x g, 5 Minuten, RT) und anschließend für 30 bis 60 Minuten in Dunkelheit in 100 µl PBS und 0,2 µl DAPI (0,1 mg/ml) inkubiert. Nach anschließendem Waschen in PBS wurden die Zellen in Medium resuspendiert und am Leica DM 6000 B Mikroskop betrachtet.

5.2.5.3 MitoTracker Orange CMTMRos-Färbung von Mitochondrien

Zur Überprüfung einer möglichen Lokalisation in Mitochondrien wurden Zellen nach erfolgter Induktion mit dem MitoTracker® Orange CMTMRos (ThermoScientific) angefärbt. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen (2.000 x g, 5 Minuten, RT) und anschließend für 30 Minuten in Dunkelheit mit dem Farbstoff in PBS (500 nM) inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in PBS resuspendiert und am Leica TCS SP2 betrachtet.

5.2.5.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (KLSM) und Epifluoreszenzmikroskopie

Die Analyse exprimierter Reporterfusionsproteine *in vivo* erfolgte unter dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS SP2 der Firma Leica Microsystems. Es wurden 5 µl einer induzierten oder angefärbten Kultur auf einen Objektträger gegeben und wahlweise unter einem HCX PL APO 40x/1.25-0.75 Oil CS Objektiv oder einem PL APO 63x/1.32-0.60, Oil Ph3 CS Objektiv betrachtet.

Die Chlorophyll und GFP Fluoreszenz wurde mit einem Argon-Laser bei 488 nm angeregt. Der MitoTracker sowie die Fluoreszenz von mRFP wurden mit einem Helium-Neon-Laser bei 543 nm

angeregt. Die Fluoreszenz wurde mit Photomultiplier auf verschiedenen Kanälen detektiert. eGFP wurde bei 500 - 525 nm, der MitoTracker bei 560 - 590 nm, mRFP bei 580 - 600 nm und die Chlorophyll Autofluoreszenz bei 625 – 720 nm detektiert.

Im Falle einer DAPI-Färbung wurden die Proben mit einem Leica DM 6000 B Mikroskop beobachtet. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampf Lampe (EL 6000/LQHXP 120 LEJ; Leica Microsystems). Es wurde das Filtersystem A für UV-Anregung, mit einem Anregungsfilter BP 360/40, einem dichromatischen Spiegel 400 und dem Emissionsfilter LP 425, sowie ein HCX PL APO 40x/0.85 CORR Objektiv genutzt.

5.2.6 *In silico* Vorhersagen von plastidären β -barrel Proteinen

Es wurde auf einen Datensatz der Genomdatenbank von *Phaeodactylum tricornutum* zurückgegriffen (PhaeoDBv2.0). Es wurden alle in der Datenbank hinterlegten Proteinmodelle für die Vorhersagen genutzt. Zunächst wurden verschiedene Algorithmen mit der Aminosäuresequenz des bekannten β -barrel Proteins ptOMP85 getestet. Es wurde der Algorithmus PSORTb 3.0 ausgewählt, um die initiale Unterscheidung zu treffen. Es wurde im Algorithmus spezifiziert, dass es sich bei dem Datensatz um Proteine eines Gram-negativen Bakteriums mit einer klassischen äußeren Membran handelt. Im Anschluss wurden die als in der äußeren Membran lokalisiert (*Outer Membrane*, OM) vorhergesagten Proteine weiteren Analysen unterzogen. Zunächst wurden mit SignalP 3.0 und 4.1 sowie TargetP 1.1 (*non-plant network*) die Zielsteuerungssequenzen vorhergesagt (Bendtsen et al. 2004; Emanuelsson et al. 2000; Petersen et al. 2011). Enthalten die Sequenzen ein Signalpeptid, wurden sie mit weiteren Algorithmen zur Vorhersage von β -barrel Proteinen analysiert (BOMP, MCMBB, TMBETADISC, BOCTOPUS2, Pred-TMBB, Pred-TMBB2). Es folgten BLAST-Analysen, um potentielle Funktionen zuordnen zu können. Außerdem wurden auch Proteine, welche als extrazellulär vorhergesagt wurden, in die Analysen mit einbezogen, sofern sie Homologe in anderen Heterokontophyten aufwiesen, ihnen keine Funktion zugeordnet werden konnte und sie keine vorhergesagten α -helicalen Transmembrandomänen (TOPCONS) enthielten. Sämtliche Kandidaten, welche durch PSORTb 3.0 als OM identifiziert wurden und ein Signalpeptid enthielten, wurden als positiv betrachtet. Extrazellulär vorhergesagte Proteine galten dann als positiv, wenn mindestens ein Algorithmus sie als β -barrel Protein charakterisierte (Bagos et al. 2004b; Berven et al. 2004; Gromiha et al. 2005; Hayat und Elofsson 2012; Hayat et al. 2016; Ou et al. 2008; Tsirigos et al. 2015; Tsirigos et al. 2016; Yu et al. 2010).

6. Literaturverzeichnis

- Aarti, I.; Rajesh, K.; Ramaiah, K. V. A. (2010): Phosphorylation of eIF2 alpha in Sf9 cells: a stress, survival and suicidal signal. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 15 (6), S. 679–692.
- Acosta-Alvear, D.; Zhou, Y.; Blais, A.; Tsikitis, M.; Lents, N. H.; Arias, C. et al. (2007): XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. In: *Molecular cell* 27 (1), S. 53–66.
- Adl, S. M.; Simpson, A. G. B.; Farmer, M. A.; Andersen, R. A.; Anderson, O. R.; Barta, J. R. et al. (2005): The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. In: *The Journal of eukaryotic microbiology* 52 (5), S. 399–451.
- Aebi, U.; Cohn, J.; Buhle, L.; Gerace, L. (1986): The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. In: *Nature* 323 (6088), S. 560–564.
- Agrawal, G.; Fassas, S. N.; Xia, Z.-J.; Subramani, S. (2016): Distinct requirements for intra-ER sorting and budding of peroxisomal membrane proteins from the ER. In: *The Journal of cell biology* 212 (3), S. 335–348.
- AhYoung, A. P.; Lu, B.; Cascio, D.; Egea, P. F. (2017): Crystal structure of Mdm12 and combinatorial reconstitution of Mdm12/Mmm1 ERMES complexes for structural studies. In: *Biochemical and biophysical research communications* 488 (1), S. 129–135.
- Akita, M.; Nielsen, E.; Keegstra, K. (1997): Identification of protein transport complexes in the chloroplastic envelope membranes via chemical cross-linking. In: *The Journal of cell biology* 136 (5), S. 983–994.
- Apt, K. E.; Kroth-Pancic, P. G.; Grossman, A. R. (1996): Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Molecular & general genetics : MGG* 252 (5), S. 572–579.
- Archibald, J. M. (2009): The puzzle of plastid evolution. In: *Current biology : CB* 19 (2), R81–88.
- Archibald, J. M. (2015): Genomic perspectives on the birth and spread of plastids. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (33), S. 10147–10153.
- Arnold, T.; Zeth, K.; Linke, D. (2010): Omp85 from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* differs from proteobacterial Omp85 in structure and domain composition. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (23), S. 18003–18015.
- Bae, W.; Lee, Y. J.; Kim, D. H.; Lee, J.; Kim, S.; Sohn, E. J.; Hwang, I. (2008): AKR2A-mediated import of chloroplast outer membrane proteins is essential for chloroplast biogenesis. In: *Nature cell biology* 10 (2), S. 220–227.
- Bagos, P. G.; Liakopoulos, T. D.; Hamodrakas, S. J. (2004a): Finding beta-barrel outer membrane proteins with a markov chain model. In: *WSEAS Transactions on Biology and Biomedicine* 2004 (2), S. 186–189.
- Bagos, P. G.; Liakopoulos, T. D.; Spyropoulos, I. C.; Hamodrakas, S. J. (2004b): PRED-TMBB: a web server for predicting the topology of beta-barrel outer membrane proteins. In: *Nucleic acids research* 32 (Web Server issue), W400–404.

- Bannykh, S. I.; Rowe, T.; Balch, W. E. (1996): The organization of endoplasmic reticulum export complexes. In: *The Journal of cell biology* 135 (1), S. 19–35.
- Barton, K.; Mathur, N.; Mathur, J. (2013): Simultaneous live-imaging of peroxisomes and the ER in plant cells suggests contiguity but no luminal continuity between the two organelles. In: *Frontiers in physiology* 4, 196.
- Baurain, D.; Brinkmann, H.; Petersen, J.; Rodriguez-Ezpeleta, N.; Stechmann, A.; Demoulin, V. et al. (2010): Phylogenomic evidence for separate acquisition of plastids in cryptophytes, haptophytes, and stramenopiles. In: *Molecular biology and evolution* 27 (7), S. 1698–1709.
- Becker, T.; Jelic, M.; Vojta, A.; Radunz, A.; Soll, J.; Schleiff, E. (2004): Preprotein recognition by the Toc complex. In: *The EMBO journal* 23 (3), S. 520–530.
- Becker, T.; Wenz, L.-S.; Thornton, N.; Stroud, D.; Meisinger, C.; Wiedemann, N.; Pfanner, N. (2011): Biogenesis of mitochondria: dual role of Tom7 in modulating assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. In: *Journal of molecular biology* 405 (1), S. 113–124.
- Bendtsen, J. D.; Nielsen, H.; Heijne, G. von; Brunak, S. (2004): Improved prediction of signal peptides. SignalP 3.0. In: *Journal of molecular biology* 340 (4), S. 783–795.
- Bernsel, A.; Viklund, H.; Falk, J.; Lindahl, E.; Heijne, G. von; Elofsson, A. (2008): Prediction of membrane-protein topology from first principles. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (20), S. 7177–7181.
- Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Hendershot, L. M.; Harding, H. P.; Ron, D. (2000): Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. In: *Nature cell biology* 2 (6), S. 326–332.
- Berven, F. S.; Flikka, K.; Jensen, H. B.; Eidhammer, I. (2004): BOMP: a program to predict integral beta-barrel outer membrane proteins encoded within genomes of Gram-negative bacteria. In: *Nucleic acids research* 32 (Web Server issue), S. W394–399.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic acids research* 7 (6), S. 1513–1523.
- Bodyl, A.; Stiller, J. W.; Mackiewicz, P. (2009): Chromalveolate plastids: direct descent or multiple endosymbioses? In: *Trends in ecology & evolution* 24 (3), S. 119–121.
- Bos, M. P.; Robert, V.; Tommassen, J. (2007): Functioning of outer membrane protein assembly factor Omp85 requires a single POTRA domain. In: *EMBO reports* 8 (12), S. 1149–1154.
- Bullmann, L.; Haarmann, R.; Mirus, O.; Bredemeier, R.; Hempel, F.; Maier, U. G.; Schleiff, E. (2010): Filling the gap, evolutionarily conserved Omp85 in plastids of chromalveolates. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (9), S. 6848–6856.
- Burki, F.; Flegontov, P.; Obornik, M.; Cihlar, J.; Pain, A.; Lukes, J.; Keeling, P. J. (2012a): Re-evaluating the green versus red signal in eukaryotes with secondary plastid of red algal origin. In: *Genome biology and evolution* 4 (6), S. 626–635.
- Burki, F.; Imanian, B.; Hehenberger, E.; Hirakawa, Y.; Maruyama, S.; Keeling, P. J. (2014): Endosymbiotic gene transfer in tertiary plastid-containing dinoflagellates. In: *Eukaryotic cell* 13 (2), S. 246–255.

- Burki, F.; Kaplan, M.; Tikhonenkov, D. V.; Zlatogursky, V.; Minh, B. Q.; Radaykina, L. V. et al. (2016): Untangling the early diversification of eukaryotes: a phylogenomic study of the evolutionary origins of Centrohelida, Haptophyta and Cryptista. In: *Proceedings. Biological sciences* 283 (1823), 20152802.
- Burki, F.; Okamoto, N.; Pombert, J.-F.; Keeling, P. J. (2012b): The evolutionary history of haptophytes and cryptophytes: phylogenomic evidence for separate origins. In: *Proceedings. Biological sciences* 279 (1736), S. 2246–2254.
- Burki, F.; Shalchian-Tabrizi, K.; Minge, M.; Skjaeveland, A.; Nikolaev, S. I.; Jakobsen, K. S.; Pawlowski, J. (2007): Phylogenomics reshuffles the eukaryotic supergroups. In: *PloS one* 2 (8), e790.
- Cavalier-Smith, T. (1999): Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. In: *The Journal of eukaryotic microbiology* 46 (4), S. 347–366.
- Cavalier-Smith, T. (2000): Membrane heredity and early chloroplast evolution. In: *Trends in plant science* 5 (4), S. 174–182.
- Cavalier-Smith, T. (2003): Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 358 (1429), 109–134.
- Cavalier-Smith, T. (2010): Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. In: *Biology letters* 6 (3), S. 342–345.
- Chen, X.; Shen, J.; Prywes, R. (2002a): The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (15), S. 13045–13052.
- Chen, X.; Smith, M. D.; Fitzpatrick, L.; Schnell, D. J. (2002b): In vivo analysis of the role of atTic20 in protein import into chloroplasts. In: *The Plant cell* 14 (3), S. 641–654.
- Chen, Y.; Brandizzi, F. (2013): IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. In: *Trends in cell biology* 23 (11), S. 547–555.
- Cheng, G.; Feng, Z.; He, B. (2005): Herpes simplex virus 1 infection activates the endoplasmic reticulum resident kinase PERK and mediates eIF-2 α dephosphorylation by the gamma(1)34.5 protein. In: *Journal of virology* 79 (3), S. 1379–1388.
- Chiribau, C.-B.; Gaccioli, F.; Huang, C. C.; Yuan, C. L.; Hatzoglou, M. (2010): Molecular symbiosis of CHOP and C/EBP beta isoform LIP contributes to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. In: *Molecular and cellular biology* 30 (14), S. 3722–3731.
- Chou, M.-L.; Chu, C.-C.; Chen, L.-J.; Akita, M.; Li, H.-M. (2006): Stimulation of transit-peptide release and ATP hydrolysis by a cochaperone during protein import into chloroplasts. In: *The Journal of cell biology* 175 (6), S. 893–900.
- Courjol, F.; Mouveaux, T.; Lesage, K.; Saliou, J.-M.; Werkmeister, E.; Bonabaud, M. et al. (2017): Characterization of a nuclear pore protein sheds light on the roles and composition of the *Toxoplasma gondii* nuclear pore complex. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74 (11), S. 2107–2125.

- Credle, J. J.; Finer-Moore, J. S.; Papa, F. R.; Stroud, R. M.; Walter, P. (2005): On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (52), S. 18773–18784.
- Cui, W.; Li, J.; Ron, D.; Sha, B. (2011): The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation. In: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 67 (Pt 5), S. 423–428.
- Cullinan, S. B.; Zhang, D.; Hannink, M.; Arvisais, E.; Kaufman, R. J.; Diehl, J. A. (2003): Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. In: *Molecular and cellular biology* 23 (20), S. 7198–7209.
- Curtis, B. A.; Tanifuji, G.; Burki, F.; Gruber, A.; Irimia, M.; Maruyama, S. et al. (2012): Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. In: *Nature* 492 (7427), S. 59–65.
- D'Arcangelo, J. G.; Stahmer, K. R.; Miller, E. A. (2013): Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. In: *Biochimica et biophysica acta* 1833 (11), S. 2464–2472.
- Day, P. M.; Potter, D.; Inoue, K. (2014): Evolution and targeting of Omp85 homologs in the chloroplast outer envelope membrane. In: *Frontiers in plant science* 5, 535.
- Deguil, J.; Pineau, L.; Rowland Snyder, E. C.; Dupont, S.; Beney, L.; Gil, A. et al. (2011): Modulation of lipid-induced ER stress by fatty acid shape. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 12 (3), S. 349–362.
- Denais, C. M.; Gilbert, R. M.; Isermann, P.; McGregor, A. L.; te Lindert, M.; Weigelin, B. et al. (2016): Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. In: *Science (New York, N.Y.)* 352 (6283), S. 353–358.
- Deschamps, P.; Moreira, D. (2012): Reevaluating the green contribution to diatom genomes. In: *Genome biology and evolution* 4 (7), S. 683–688.
- Dewez, D.; Park, S.; García-Cerdán, J. G.; Lindberg, P.; Melis, A. (2009): Mechanism of REP27 protein action in the D1 protein turnover and photosystem II repair from photodamage. In: *Plant physiology* 151 (1), S. 88–99.
- Dhanao, P. K.; Richardson, L. G. L.; Smith, M. D.; Gidda, S. K.; Henderson, M. P. A.; Andrews, D. W.; Mullen, R. T. (2010): Distinct pathways mediate the sorting of tail-anchored proteins to the plastid outer envelope. In: *PLoS one* 5 (4), e10098.
- Dorrell, R. G.; Smith, A. G. (2011): Do red and green make brown?: perspectives on plastid acquisitions within chromalveolates. In: *Eukaryotic cell* 10 (7), S. 856–868.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990): A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. In: *Focus* (12), S. 13–15.
- DuRose, J. B.; Scheuner, D.; Kaufman, R. J.; Rothblum, L. I.; Niwa, M. (2009): Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α coordinates rRNA transcription and translation inhibition during endoplasmic reticulum stress. In: *Molecular and cellular biology* 29 (15), S. 4295–4307.

- Echevarría, W.; Leite, M. F.; Guerra, M. T.; Zipfel, W. R.; Nathanson, M. H. (2003): Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. In: *Nature cell biology* 5 (5), S. 440–446.
- Elias, M.; Archibald, J. M. (2009): Sizing up the genomic footprint of endosymbiosis. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 31 (12), S. 1273–1279.
- Ellenrieder, L.; Opaliński, Ł.; Becker, L.; Krüger, V.; Mirus, O.; Straub, S. P. et al. (2016): Separating mitochondrial protein assembly and endoplasmic reticulum tethering by selective coupling of Mdm10. In: *Nature communications* 7, 13021.
- Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; Brunak, S.; Heijne, G. von (2000): Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. In: *Journal of molecular biology* 300 (4), S. 1005–1016.
- Endo, T.; Kawano, S.; Yamano, K. (2011): BamE structure. The assembly of β -barrel proteins in the outer membranes of bacteria and mitochondria. In: *EMBO reports* 12 (2), S. 94–95.
- Fellerer, C.; Schweiger, R.; Schongrubner, K.; Soll, J.; Schwenkert, S. (2011): Cytosolic HSP90 cochaperones HOP and FKBP interact with freshly synthesized chloroplast preproteins of Arabidopsis. In: *Molecular plant* 4 (6), S. 1133–1145.
- Felsner, G.; Sommer, M. S.; Gruenheit, N.; Hempel, F.; Moog, D.; Zauner, S. et al. (2011): ERAD components in organisms with complex red plastids suggest recruitment of a preexisting protein transport pathway for the periplastid membrane. In: *Genome biology and evolution* 3, S. 140–150.
- Felsner, G.; Sommer, M. S.; Maier, U. G. (2010): The physical and functional borders of transit peptide-like sequences in secondary endosymbionts. In: *BMC plant biology* 10, 223.
- Flinner, N.; Ellenrieder, L.; Stiller, S. B.; Becker, T.; Schleiff, E.; Mirus, O. (2013): Mdm10 is an ancient eukaryotic porin co-occurring with the ERMES complex. In: *Biochimica et biophysica acta* 1833 (12), S. 3314–3325.
- Foth, B. J.; Ralph, S. A.; Tonkin, C. J.; Struck, N. S.; Fraunholz, M.; Roos, D. S. et al. (2003): Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite Plasmodium falciparum. In: *Science (New York, N.Y.)* 299 (5607), S. 705–708.
- Fricker, M.; Hollinshead, M.; White, N.; Vaux, D. (1997): Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. In: *The Journal of cell biology* 136 (3), S. 531–544.
- Frost, A.; Elgort, M. G.; Brandman, O.; Ives, C.; Collins, S. R.; Miller-Vedam, L. et al. (2012): Functional repurposing revealed by comparing *S. pombe* and *S. cerevisiae* genetic interactions. In: *Cell* 149 (6), S. 1339–1352.
- Gardner, B. M.; Walter, P. (2011): Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. In: *Science (New York, N.Y.)* 333 (6051), S. 1891–1894.
- Gibbs, S. P. (1979): The route of entry of cytoplasmically synthesized proteins into chloroplasts of algae possessing chloroplast ER. In: *Journal of cell science* 35, S. 253–266.
- Gibson, D. G.; Smith, H. O.; Hutchison, C. A. 3.; Venter, J. C.; Merryman, C. (2010): Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. In: *Nature methods* 7 (11), S. 901–903.

- Gibson, D. G.; Young, L.; Chuang, R.-Y.; Venter, J. C.; Hutchison, C. A. 3.; Smith, H. O. (2009): Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. In: *Nature methods* 6 (5), S. 343–345.
- Glaser, S.; van Dooren, G. G.; Agrawal, S.; Brooks, C. F.; McFadden, G. I.; Striepen, B.; Higgins, M. K. (2012): Tic22 is an essential chaperone required for protein import into the apicoplast. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (47), S. 39505–39512.
- Goldshmidt, H.; Matas, D.; Kabi, A.; Carmi, S.; Hope, R.; Michaeli, S. (2010): Persistent ER stress induces the spliced leader RNA silencing pathway (SLS), leading to programmed cell death in *Trypanosoma brucei*. In: *PLoS pathogens* 6 (1), e1000731.
- Görlich, D.; Prehn, S.; Hartmann, E.; Kalies, K. U.; Rapoport, T. A. (1992): A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. In: *Cell* 71 (3), S. 489–503.
- Gosline, S. J. C.; Nascimento, M.; McCall, L.-I.; Zilberstein, D.; Thomas, D. Y.; Matlashewski, G.; Hallett, M. (2011): Intracellular eukaryotic parasites have a distinct unfolded protein response. In: *PloS one* 6 (4), e19118.
- Gould, S. B.; Maier, U.-G.; Martin, W. F. (2015): Protein import and the origin of red complex plastids. In: *Current biology : CB* 25 (12), R515–521.
- Gould, S. B.; Sommer, M. S.; Kroth, P. G.; Gile, G. H.; Keeling, P. J.; Maier, U.-G. (2006): Nucleus-to-nucleus gene transfer and protein retargeting into a remnant cytoplasm of cryptophytes and diatoms. In: *Molecular biology and evolution* 23 (12), S. 2413–2422.
- Gould, S. B.; Waller, R. F.; McFadden, G. I. (2008): Plastid evolution. In: *Annual review of plant biology* 59, S. 491–517.
- Gromiha, M. M.; Ahmad, S.; Suwa, M. (2005): TMBETA-NET: discrimination and prediction of membrane spanning beta-strands in outer membrane proteins. In: *Nucleic acids research* 33 (Web Server issue), W164–167.
- Gruber, A.; Rocap, G.; Kroth, P. G.; Armbrust, E. V.; Mock, T. (2015): Plastid proteome prediction for diatoms and other algae with secondary plastids of the red lineage. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 81 (3), S. 519–528.
- Gu, Y.; Li, H.; Dong, H.; Zeng, Y.; Zhang, Z.; Paterson, N. G. et al. (2016): Structural basis of outer membrane protein insertion by the BAM complex. In: *Nature* 531 (7592), S. 64–69.
- Guo, J.; Polymenis, M. (2006): Dcr2 targets Ire1 and downregulates the unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *EMBO reports* 7 (11), S. 1124–1127.
- Gupta, A.; Hossain, M. M.; Read, D. E.; Hetz, C.; Samali, A.; Gupta, S. (2015): PERK regulated miR-424(322)-503 cluster fine-tunes activation of IRE1 and ATF6 during Unfolded Protein Response. In: *Scientific reports* 5, 18304.
- Habib, S. J.; Waizenegger, T.; Lech, M.; Neupert, W.; Rapoport, D. (2005): Assembly of the TOB complex of mitochondria. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (8), S. 6434–6440.
- Habib, S. J.; Waizenegger, T.; Niewianda, A.; Paschen, S. A.; Neupert, W.; Rapoport, D. (2007): The N-terminal domain of Tob55 has a receptor-like function in the biogenesis of mitochondrial beta-barrel proteins. In: *The Journal of cell biology* 176 (1), S. 77–88.

- Hackett, J. D.; Yoon, H. S.; Li, S.; Reyes-Prieto, A.; Rümmele, S. E.; Bhattacharya, D. (2007): Phylogenomic analysis supports the monophyly of cryptophytes and haptophytes and the association of rhizaria with chromalveolates. In: *Molecular biology and evolution* 24 (8), S. 1702–1713.
- Harding, H. P.; Novoa, I.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Wek, R.; Schapira, M.; Ron, D. (2000a): Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. In: *Molecular cell* 6 (5), S. 1099–1108.
- Harding, H. P.; Zhang, Y.; Bertolotti, A.; Zeng, H.; Ron, D. (2000b): Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. In: *Molecular cell* 5 (5), S. 897–904.
- Harding, H. P.; Zhang, Y.; Ron, D. (1999): Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. In: *Nature* 397 (6716), S. 271–274.
- Harper, J. T.; Keeling, P. J. (2003): Nucleus-encoded, plastid-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) indicates a single origin for chromalveolate plastids. In: *Molecular biology and evolution* 20 (10), S. 1730–1735.
- Harper, J. T.; Waanders, E.; Keeling, P. J. (2005): On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55 (Pt 1), S. 487–496.
- Hayashi, S.; Takahashi, H.; Wakasa, Y.; Kawakatsu, T.; Takaiwa, F. (2013): Identification of a cis-element that mediates multiple pathways of the endoplasmic reticulum stress response in rice. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 74 (2), S. 248–257.
- Hayashi, S.; Wakasa, Y.; Takahashi, H.; Kawakatsu, T.; Takaiwa, F. (2012): Signal transduction by IRE1-mediated splicing of bZIP50 and other stress sensors in the endoplasmic reticulum stress response of rice. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 69 (6), S. 946–956.
- Hayat, S.; Elofsson, A. (2012): BOCTOPUS: improved topology prediction of transmembrane beta barrel proteins. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 28 (4), S. 516–522.
- Hayat, S.; Peters, C.; Shu, N.; Tsigos, K. D.; Elofsson, A. (2016): Inclusion of dyad-repeat pattern improves topology prediction of transmembrane beta-barrel proteins. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 32 (10), S. 1571–1573.
- Haze, K.; Okada, T.; Yoshida, H.; Yanagi, H.; Yura, T.; Negishi, M.; Mori, K. (2001): Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. In: *The Biochemical journal* 355 (Pt 1), S. 19–28.
- Hehenberger, E.; Imanian, B.; Burki, F.; Keeling, P. J. (2014): Evidence for the retention of two evolutionary distinct plastids in dinoflagellates with diatom endosymbionts. In: *Genome biology and evolution* 6 (9), S. 2321–2334.
- Heiny, S. R.; Pautz, S.; Recker, M.; Przyborski, J. M. (2014): Protein Traffic to the Plasmodium falciparum apicoplast: evidence for a sorting branch point at the Golgi. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 15 (12), S. 1290–1304.

- Hempel, F.; Bullmann, L.; Lau, J.; Zauner, S.; Maier, U. G. (2009): ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. In: *Molecular biology and evolution* 26 (8), S. 1781–1790.
- Heuck, A.; Schleiffer, A.; Clausen, T. (2011): Augmenting β -augmentation. Structural basis of how BamB binds BamA and may support folding of outer membrane proteins. In: *Journal of molecular biology* 406 (5), S. 659–666.
- Hoepfner, D.; Schildknecht, D.; Braakman, I.; Philippsen, P.; Tabak, H. F. (2005): Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. In: *Cell* 122 (1), S. 85–95.
- Hollien, J. (2013): Evolution of the unfolded protein response. In: *Biochimica et biophysica acta* 1833 (11), S. 2458–2463.
- Hollien, J.; Lin, J. H.; Li, H.; Stevens, N.; Walter, P.; Weissman, J. S. (2009): Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. In: *The Journal of cell biology* 186 (3), S. 323–331.
- Hollien, J.; Weissman, J. S. (2006): Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. In: *Science (New York, N.Y.)* 313 (5783), S. 104–107.
- Hooks, K. B.; Griffiths-Jones, S. (2011): Conserved RNA structures in the non-canonical Hac1/Xbp1 intron. In: *RNA biology* 8 (4), S. 552–556.
- Huesgen, P. F.; Alami, M.; Lange, P. F.; Foster, L. J.; Schroder, W. P.; Overall, C. M.; Green, B. R. (2013): Proteomic amino-terminal profiling reveals targeting information for protein import into complex plastids. In: *PloS one* 8 (9), e74483.
- Iadanza, M. G.; Higgins, A. J.; Schiffrin, B.; Calabrese, A. N.; Brockwell, D. J.; Ashcroft, A. E. et al. (2016): Lateral opening in the intact beta-barrel assembly machinery captured by cryo-EM. In: *Nature communications* 7, 12865.
- Imagawa, Y.; Hosoda, A.; Sasaka, S.-I.; Tsuru, A.; Kohno, K. (2008): RNase domains determine the functional difference between IRE1 α and IRE1 β . In: *FEBS letters* 582 (5), S. 656–660.
- Inaba, T.; Li, M.; Alvarez-Huerta, M.; Kessler, F.; Schnell, D. J. (2003): atTic110 functions as a scaffold for coordinating the stromal events of protein import into chloroplasts. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (40), S. 38617–38627.
- Inoue, K.; Keegstra, K. (2003): A polyglycine stretch is necessary for proper targeting of the protein translocation channel precursor to the outer envelope membrane of chloroplasts. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 34 (5), S. 661–669.
- Inoue, K.; Potter, D. (2004): The chloroplastic protein translocation channel Toc75 and its paralog OEP80 represent two distinct protein families and are targeted to the chloroplastic outer envelope by different mechanisms. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 39 (3), S. 354–365.
- Ishiwata-Kimata, Y.; Promlek, T.; Kohno, K.; Kimata, Y. (2013): BiP-bound and nonclustered mode of Ire1 evokes a weak but sustained unfolded protein response. In: *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 18 (4), S. 288–301.

- Iwata, Y.; Ashida, M.; Hasegawa, C.; Tabara, K.; Mishiba, K.-I.; Koizumi, N. (2017): Activation of the Arabidopsis membrane-bound transcription factor bZIP28 is mediated by site-2 protease, but not site-1 protease. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 91 (3), S. 408–415.
- Janouskovec, J.; Horák, A.; Oborník, M.; Lukes, J.; Keeling, P. J. (2010): A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (24), S. 10949–10954.
- Joshi, A. S.; Huang, X.; Choudhary, V.; Levine, T. P.; Hu, J.; Prinz, W. A. (2016): A family of membrane-shaping proteins at ER subdomains regulates pre-peroxisomal vesicle biogenesis. In: *The Journal of cell biology* 215 (4), S. 515–529.
- Kakoi, S.; Yorimitsu, T.; Sato, K. (2013): COPII machinery cooperates with ER-localized Hsp40 to sequester misfolded membrane proteins into ER-associated compartments. In: *Molecular biology of the cell* 24 (5), S. 633–642.
- Käll, L.; Krogh, A.; Sonnhammer, E. L. L. (2004): A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. In: *Journal of molecular biology* 338 (5), S. 1027–1036.
- Käll, L.; Krogh, A.; Sonnhammer, E. L. L. (2007): Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. In: *Nucleic acids research* 35 (Web Server issue), W429-432.
- Kamhi-Nesher, S.; Shenkman, M.; Tolchinsky, S.; Fromm, S. V.; Ehrlich, R.; Lederkremer, G. Z. (2001): A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum. In: *Molecular biology of the cell* 12 (6), S. 1711–1723.
- Kannan, M.; Lahiri, S.; Liu, L.-K.; Choudhary, V.; Prinz, W. A. (2017): Phosphatidylserine synthesis at membrane contact sites promotes its transport out of the ER. In: *Journal of lipid research* 58 (3), S. 553–562.
- Karnik, S. K.; Trelease, R. N. (2005): Arabidopsis peroxin 16 coexists at steady state in peroxisomes and endoplasmic reticulum. In: *Plant physiology* 138 (4), S. 1967–1981.
- Karnik, S. K.; Trelease, R. N. (2007): Arabidopsis peroxin 16 trafficks through the ER and an intermediate compartment to pre-existing peroxisomes via overlapping molecular targeting signals. In: *Journal of experimental botany* 58 (7), S. 1677–1693.
- Kessler, F.; Blobel, G.; Patel, H. A.; Schnell, D. J. (1994): Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. In: *Science (New York, N.Y.)* 266 (5187), S. 1035–1039.
- Kikuchi, S.; Bedard, J.; Hirano, M.; Hirabayashi, Y.; Oishi, M.; Imai, M. et al. (2013): Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope membrane. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6119), S. 571–574.
- Kilian, O.; Kroth, P. G. (2005): Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 41 (2), S. 175–183.
- Kim, D. H.; Lee, J.-E.; Xu, Z.-Y.; Geem, K. R.; Kwon, Y.; Park, J. W.; Hwang, I. (2015): Cytosolic targeting factor AKR2A captures chloroplast outer membrane-localized client proteins at the ribosome during translation. In: *Nature communications* 6, S. 6843.

- Kim, D. H.; Park, M.-J.; Gwon, G. H.; Silkov, A.; Xu, Z.-Y.; Yang, E. C. et al. (2014): An ankyrin repeat domain of AKR2 drives chloroplast targeting through coincident binding of two chloroplast lipids. In: *Developmental cell* 30 (5), S. 598–609.
- Kim, J. I.; Moore, C. E.; Archibald, J. M.; Bhattacharya, D.; Yi, G.; Yoon, H. S.; Shin, W. (2017): Evolutionary Dynamics of Cryptophyte Plastid Genomes. In: *Genome biology and evolution* 9 (7), S. 1859–1872.
- Kim, K. H.; Aulakh, S.; Paetzel, M. (2011a): Crystal structure of β -barrel assembly machinery BamCD protein complex. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (45), S. 39116–39121.
- Kim, K. H.; Aulakh, S.; Paetzel, M. (2012): The bacterial outer membrane beta-barrel assembly machinery. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 21 (6), S. 751–768.
- Kim, K. H.; Aulakh, S.; Tan, W.; Paetzel, M. (2011b): Crystallographic analysis of the C-terminal domain of the Escherichia coli lipoprotein BamC. In: *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 67 (Pt 11), S. 1350–1358.
- Kim, K. H.; Paetzel, M. (2011): Crystal structure of Escherichia coli BamB, a lipoprotein component of the β -barrel assembly machinery complex. In: *Journal of molecular biology* 406 (5), S. 667–678.
- Kim, P. K.; Mullen, R. T.; Schumann, U.; Lippincott-Schwartz, J. (2006): The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. In: *The Journal of cell biology* 173 (4), S. 521–532.
- Kim, S.; Malinverni, J. C.; Sliz, P.; Silhavy, T. J.; Harrison, S. C.; Kahne, D. (2007): Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. In: *Science (New York, N.Y.)* 317 (5840), S. 961–964.
- Kimata, Y.; Ishiwata-Kimata, Y.; Yamada, S.; Kohno, K. (2006): Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. In: *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 11 (1), S. 59–69.
- Kimmig, P.; Diaz, M.; Zheng, J.; Williams, C. C.; Lang, A.; Aragón, T. et al. (2012): The unfolded protein response in fission yeast modulates stability of select mRNAs to maintain protein homeostasis. In: *eLife* 1, e00048.
- Knowles, T. J.; Jeeves, M.; Bobat, S.; Dancea, F.; McClelland, D.; Palmer, T. et al. (2008): Fold and function of polypeptide transport-associated domains responsible for delivering unfolded proteins to membranes. In: *Molecular microbiology* 68 (5), S. 1216–1227.
- Kobylewski, S. E.; Henderson, K. A.; Yamada, K. E.; Eckhert, C. D. (2017): Activation of the EIF2 α /ATF4 and ATF6 Pathways in DU-145 Cells by Boric Acid at the Concentration Reported in Men at the US Mean Boron Intake. In: *Biological trace element research* 176 (2), S. 278–293.
- Kutik, S.; Stojanovski, D.; Becker, L.; Becker, T.; Meinecke, M.; Krüger, V. et al. (2008): Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins. In: *Cell* 132 (6), S. 1011–1024.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Lahiri, S.; Chao, J. T.; Tavassoli, S.; Wong, A. K. O.; Choudhary, V.; Young, B. P. et al. (2014): A conserved endoplasmic reticulum membrane protein complex (EMC) facilitates phospholipid transfer from the ER to mitochondria. In: *PLoS biology* 12 (10), e1001969.

- Lang, M.; Apt, K. E.; Kroth, P. G. (1998): Protein transport into "complex" diatom plastids utilizes two different targeting signals. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (47), S. 30973–30978.
- Lau, J. B.; Stork, S.; Moog, D.; Sommer, M. S.; Maier, U. G. (2015): N-terminal lysines are essential for protein translocation via a modified ERAD system in complex plastids. In: *Molecular microbiology* 96 (3), S. 609–620.
- Le Sun; Lu, S.-J.; Zhang, S.-S.; Zhou, S.-F.; Sun, L.; Liu, J.-X. (2013): The lumen-facing domain is important for the biological function and organelle-to-organelle movement of bZIP28 during ER stress in Arabidopsis. In: *Molecular plant* 6 (5), S. 1605–1615.
- Lee, K. P. K.; Dey, M.; Neculai, D.; Cao, C.; Dever, T. E.; Sicheri, F. (2008): Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. In: *Cell* 132 (1), S. 89–100.
- Lee, Y. J.; Kim, D. H.; Kim, Y. W.; Hwang, I. (2001): Identification of a signal that distinguishes between the chloroplast outer envelope membrane and the endomembrane system in vivo. In: *The Plant cell* 13 (10), S. 2175–2190.
- Lee, Y. J.; Sohn, E. J.; Lee, K. H.; Lee, D. W.; Hwang, I. (2004): The transmembrane domain of AtToc64 and its C-terminal lysine-rich flanking region are targeting signals to the chloroplast outer envelope membrane correction. In: *Molecules and cells* 17 (2), S. 281–291.
- Lee, Y.-Y.; Cevallos, R. C.; Jan, E. (2009): An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2 α phosphorylation. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (11), S. 6661–6673.
- Lehr, U.; Schütz, M.; Oberhettinger, P.; Ruiz-Perez, F.; Donald, J. W.; Palmer, T. et al. (2010): C-terminal amino acid residues of the trimeric autotransporter adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica* are decisive for its recognition and assembly by BamA. In: *Molecular microbiology* 78 (4), S. 932–946.
- Li, H. m.; Chen, L. J. (1996): Protein targeting and integration signal for the chloroplastic outer envelope membrane. In: *The Plant cell* 8 (11), S. 2117–2126.
- Li, H. m.; Chen, L. J. (1997): A novel chloroplastic outer membrane-targeting signal that functions at both termini of passenger polypeptides. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (16), S. 10968–10974.
- Liu, J.-X.; Howell, S. H. (2010): bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in Arabidopsis. In: *The Plant cell* 22 (3), S. 782–796.
- Liu, J.-X.; Srivastava, R.; Che, P.; Howell, S. H. (2007): An endoplasmic reticulum stress response in Arabidopsis is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. In: *The Plant cell* 19 (12), S. 4111–4119.
- Liu, M.; Feng, Z.; Ke, H.; Liu, Y.; Sun, T.; Dai, J. et al. (2017): Tango1 spatially organizes ER exit sites to control ER export. In: *The Journal of cell biology* 216 (4), S. 1035–1049.
- Liu, X.; Hempel, F.; Stork, S.; Bolte, K.; Moog, D.; Heimerl, T. et al. (2016): Addressing various compartments of the diatom model organism *Phaeodactylum tricornutum* via sub-cellular marker proteins. In: *Algal Research* 20, S. 249–257.

- Loeffelholz, O. von; Kriechbaumer, V.; Ewan, R. A.; Jonczyk, R.; Lehmann, S.; Young, J. C.; Abell, B. M. (2011): OEP61 is a chaperone receptor at the plastid outer envelope. In: *The Biochemical journal* 438 (1), S. 143–153.
- Lyons, T. W.; Reinhard, C. T.; Planavsky, N. J. (2014): The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. In: *Nature* 506 (7488), S. 307–315.
- Maeda, M.; Katada, T.; Saito, K. (2017): TANGO1 recruits Sec16 to coordinately organize ER exit sites for efficient secretion. In: *The Journal of cell biology* 216 (6), S. 1731–1743.
- Maeda, M.; Saito, K.; Katada, T. (2016): Distinct isoform-specific complexes of TANGO1 cooperatively facilitate collagen secretion from the endoplasmic reticulum. In: *Molecular biology of the cell* 27 (17), S. 2688–2696.
- Malhas, A.; Goulbourne, C.; Vaux, D. J. (2011): The nucleoplasmic reticulum: form and function. In: *Trends in cell biology* 21 (6), S. 362–373.
- Margulis, Lynn (1970): Origin of eucaryotic cells. New Haven: Yale university press.
- Marin, B.; Nowack, E. C. M.; Melkonian, M. (2005): A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. In: *Protist* 156 (4), S. 425–432.
- Martin; Herrmann (1998): Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? In: *Plant physiology* 118 (1), S. 9–17.
- Martin, W.; Rujan, T.; Richly, E.; Hansen, A.; Cornelsen, S.; Lins, T. et al. (2002): Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19), S. 12246–12251.
- May, T.; Soll, J. (2000): 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. In: *The Plant cell* 12 (1), S. 53–64.
- Mayerhofer, P. U. (2016): Targeting and insertion of peroxisomal membrane proteins. ER trafficking versus direct delivery to peroxisomes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1863 (5), S. 870–880.
- Mayerhofer, P. U.; Bañó-Polo, M.; Mingarro, I.; Johnson, A. E. (2016): Human Peroxin PEX3 Is Co-translationally Integrated into the ER and Exits the ER in Budding Vesicles. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 17 (2), S. 117–130.
- McMahon, C.; Studer, S. M.; Clendinen, C.; Dann, G. P.; Jeffrey, P. D.; Hughson, F. M. (2012): The structure of Sec12 implicates potassium ion coordination in Sar1 activation. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (52), S. 43599–43606.
- McMorran, L. M.; Bartlett, A. I.; Huysmans, G. H. M.; Radford, S. E.; Brockwell, D. J. (2013): Dissecting the effects of periplasmic chaperones on the in vitro folding of the outer membrane protein PagP. In: *Journal of molecular biology* 425 (17), S. 3178–3191.
- Meisinger, C.; Rissler, M.; Chacinska, A.; Szklarz, L. K. S.; Milenkovic, D.; Kozjak, V. et al. (2004): The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. In: *Developmental cell* 7 (1), S. 61–71.

- Meisinger, C.; Wiedemann, N.; Rissler, M.; Strub, A.; Milenkovic, D.; Schönfisch, B. et al. (2006): Mitochondrial protein sorting. Differentiation of beta-barrel assembly by Tom7-mediated segregation of Mdm10. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (32), S. 22819–22826.
- Misra, R. (2012): Assembly of the beta-Barrel Outer Membrane Proteins in Gram-Negative Bacteria, Mitochondria, and Chloroplasts. In: *ISRN molecular biology* 2012, 708203.
- Montegna, E. A.; Bhawe, M.; Liu, Y.; Bhattacharyya, D.; Glick, B. S. (2012): Sec12 binds to Sec16 at transitional ER sites. In: *PloS one* 7 (2), e31156.
- Moog, D.; Rensing, S. A.; Archibald, J. M.; Maier, U. G.; Ullrich, K. K. (2015): Localization and Evolution of Putative Triose Phosphate Translocators in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Genome biology and evolution* 7 (11), S. 2955–2969.
- Moore, K.; Hollien, J. (2015): Ire1-mediated decay in mammalian cells relies on mRNA sequence, structure, and translational status. In: *Molecular biology of the cell* 26 (16), S. 2873–2884.
- Moraes, M. C. S.; Jesus, T. C. L.; Hashimoto, N. N.; Dey, M.; Schwartz, K. J.; Alves, V. S. et al. (2007): Novel membrane-bound eIF2alpha kinase in the flagellar pocket of *Trypanosoma brucei*. In: *Eukaryotic cell* 6 (11), S. 1979–1991.
- Mori, K. (2009): Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. In: *Journal of biochemistry* 146 (6), S. 743–750.
- Moustafa, A.; Beszteri, B.; Maier, U. G.; Bowler, C.; Valentin, K.; Bhattacharya, D. (2009): Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. In: *Science (New York, N.Y.)* 324 (5935), S. 1724–1726.
- Mullen, R. T.; Lisenbee, C. S.; Miernyk, J. A.; Trelease, R. N. (1999): Peroxisomal membrane ascorbate peroxidase is sorted to a membranous network that resembles a subdomain of the endoplasmic reticulum. In: *The Plant cell* 11 (11), S. 2167–2185.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, S. 263–273.
- Narasimhan, J.; Joyce, B. R.; Naguleswaran, A.; Smith, A. T.; Livingston, M. R.; Dixon, S. E. et al. (2008): Translation regulation by eukaryotic initiation factor-2 kinases in the development of latent cysts in *Toxoplasma gondii*. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (24), S. 16591–16601.
- Noinaj, N.; Gumbart, J. C.; Buchanan, S. K. (2017): The beta-barrel assembly machinery in motion. In: *Nature reviews. Microbiology* 15 (4), S. 197–204.
- Noinaj, N.; Kuszak, A. J.; Balusek, C.; Gumbart, J. C.; Buchanan, S. K. (2014): Lateral opening and exit pore formation are required for BamA function. In: *Structure (London, England : 1993)* 22 (7), S. 1055–1062.
- Novoa, I.; Zeng, H.; Harding, H. P.; Ron, D. (2001): Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. In: *The Journal of cell biology* 153 (5), S. 1011–1022.

- Novoa, I.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Jungreis, R.; Harding, H. P.; Ron, D. (2003): Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. In: *The EMBO journal* 22 (5), S. 1180–1187.
- Nowack, E. C. M.; Grossman, A. R. (2012): Trafficking of protein into the recently established photosynthetic organelles of *Paulinella chromatophora*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (14), S. 5340–5345.
- Nowack, E. C. M.; Price, D. C.; Bhattacharya, D.; Singer, A.; Melkonian, M.; Grossman, A. R. (2016): Gene transfers from diverse bacteria compensate for reductive genome evolution in the chromatophore of *Paulinella chromatophora*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (43), S. 12214–12219.
- Nowack, E. C. M.; Vogel, H.; Groth, M.; Grossman, A. R.; Melkonian, M.; Glockner, G. (2011): Endosymbiotic gene transfer and transcriptional regulation of transferred genes in *Paulinella chromatophora*. In: *Molecular biology and evolution* 28 (1), S. 407–422.
- Ott, C.; Ross, K.; Straub, S.; Thiede, B.; Gotz, M.; Goosmann, C. et al. (2012): Sam50 functions in mitochondrial intermembrane space bridging and biogenesis of respiratory complexes. In: *Molecular and cellular biology* 32 (6), S. 1173–1188.
- Ou, Y.-Y.; Gromiha, M. M.; Chen, S.-A.; Suwa, M. (2008): TMBETADISC-RBF: Discrimination of beta-barrel membrane proteins using RBF networks and PSSM profiles. In: *Computational biology and chemistry* 32 (3), S. 227–231.
- Paila, Y. D.; Richardson, L. G.; Inoue, H.; Parks, E. S.; McMahon, J.; Inoue, K.; Schnell, D. J. (2016): Multi-functional roles for the polypeptide transport associated domains of Toc75 in chloroplast protein import. In: *eLife* 5, e12631.
- Paila, Y. D.; Richardson, L. G. L.; Schnell, D. J. (2015): New insights into the mechanism of chloroplast protein import and its integration with protein quality control, organelle biogenesis and development. In: *Journal of molecular biology* 427 (5), S. 1038–1060.
- Patron, N. J.; Waller, R. F. (2007): Transit peptide diversity and divergence: A global analysis of plastid targeting signals. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 29 (10), S. 1048–1058.
- Petersen, J.; Ludewig, A.-K.; Michael, V.; Bunk, B.; Jarek, M.; Baurain, D.; Brinkmann, H. (2014): *Chromera velia*, endosymbioses and the rhodoplex hypothesis--plastid evolution in cryptophytes, alveolates, stramenopiles, and haptophytes (CASH lineages). In: *Genome biology and evolution* 6 (3), S. 666–684.
- Petersen, T. N.; Brunak, S.; Heijne, G. von; Nielsen, H. (2011): SignalP 4.0. Discriminating signal peptides from transmembrane regions. In: *Nature methods* 8 (10), S. 785–786.
- Peyro, M.; Soheilypour, M.; Ghavami, A.; Mofrad, M. R. K. (2015): Nucleoporin's Like Charge Regions Are Major Regulators of FG Coverage and Dynamics Inside the Nuclear Pore Complex. In: *PLoS one* 10 (12), e0143745.
- Pincus, D.; Chevalier, M. W.; Aragón, T.; van Anken, E.; Vidal, S. E.; El-Samad, H.; Walter, P. (2010): BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. In: *PLoS biology* 8 (7), e1000415.

- Pineau, L.; Colas, J.; Dupont, S.; Beney, L.; Fleurat-Lessard, P.; Berjeaud, J.-M. et al. (2009): Lipid-induced ER stress: synergistic effects of sterols and saturated fatty acids. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 10 (6), S. 673–690.
- Promlek, T.; Ishiwata-Kimata, Y.; Shido, M.; Sakuramoto, M.; Kohno, K.; Kimata, Y. (2011): Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1 in different ways. In: *Molecular biology of the cell* 22 (18), S. 3520–3532.
- Qbadou, S.; Becker, T.; Mirus, O.; Tews, I.; Soll, J.; Schleiff, E. (2006): The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64. In: *The EMBO journal* 25 (9), S. 1836–1847.
- Randall, A.; Cheng, J.; Sweredoski, M.; Baldi, P. (2008): TMBpro. Secondary structure, beta-contact and tertiary structure prediction of transmembrane beta-barrel proteins. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 24 (4), S. 513–520.
- Reynolds, S. M.; Käll, L.; Riffle, M. E.; Bilmes, J. A.; Noble, W. S. (2008): Transmembrane topology and signal peptide prediction using dynamic bayesian networks. In: *PLoS computational biology* 4 (11), e1000213.
- Richter, S.; Lamppa, G. K. (1998): A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (13), S. 7463–7468.
- Rogers, M. B.; Gilson, P. R.; Su, V.; McFadden, G. I.; Keeling, P. J. (2007): The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigeloviella natans*. Evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. In: *Molecular biology and evolution* 24 (1), S. 54–62.
- Rolls, M. M.; Hall, D. H.; Victor, M.; Stelzer, E. H. K.; Rapoport, T. A. (2002): Targeting of rough endoplasmic reticulum membrane proteins and ribosomes in invertebrate neurons. In: *Molecular biology of the cell* 13 (5), S. 1778–1791.
- Roy Choudhury, A.; Novic, M. (2015): PredbetaTM: A Novel beta-Transmembrane Region Prediction Algorithm. In: *PloS one* 10 (12), e0145564.
- Saito, K.; Chen, M.; Bard, F.; Chen, S.; Zhou, H.; Woodley, D. et al. (2009): TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. In: *Cell* 136 (5), S. 891–902.
- Saito, K.; Yamashiro, K.; Shimazu, N.; Tanabe, T.; Kontani, K.; Katada, T. (2014): Concentration of Sec12 at ER exit sites via interaction with cTAGE5 is required for collagen export. In: *The Journal of cell biology* 206 (6), S. 751–762.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (Hg.) (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. New York.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandoval, C. M.; Baker, S. L.; Jansen, K.; Metzner, S. I.; Sousa, M. C. (2011): Crystal structure of BamD. An essential component of the β -Barrel assembly machinery of gram-negative bacteria. In: *Journal of molecular biology* 409 (3), S. 348–357.
- Santi-Rocca, J.; Smith, S.; Weber, C.; Pineda, E.; Hon, C.-C.; Saavedra, E. et al. (2012): Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanism is activated in *Entamoeba histolytica* upon treatment with nitric oxide. In: *PloS one* 7 (2), e31777.

- Sato, Y.; Nadanaka, S.; Okada, T.; Okawa, K.; Mori, K. (2011): Luminal domain of ATF6 alone is sufficient for sensing endoplasmic reticulum stress and subsequent transport to the Golgi apparatus. In: *Cell structure and function* 36 (1), S. 35–47.
- Schaffner, W.; Weissmann, C. (1973): A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. In: *Analytical biochemistry* 56 (2), S. 502–514.
- Schopf, W. J. (2011): The paleobiological record of photosynthesis. In: *Photosynthesis research* 107 (1), S. 87–101.
- Shang, W.; Feierabend, J. (1998): Slow turnover of the D1 reaction center protein of photosystem II in leaves of high mountain plants. In: *FEBS letters* 425 (1), S. 97–100.
- Sheiner, L.; Fellows, J. D.; Ovcariakova, J.; Brooks, C. F.; Agrawal, S.; Holmes, Z. C. et al. (2015): Toxoplasma gondii Toc75 Functions in Import of Stromal but not Peripheral Apicoplast Proteins. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 16 (12), S. 1254–1269.
- Sheiner, L.; Striepen, B. (2013): Protein sorting in complex plastids. In: *Biochimica et biophysica acta* 1833 (2), S. 352–359.
- Shen, J.; Chen, X.; Hendershot, L.; Prywes, R. (2002): ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. In: *Developmental cell* 3 (1), S. 99–111.
- Simm, S.; Papasotiriou, D. G.; Ibrahim, M.; Leisegang, M. S.; Müller, B.; Schorge, T. et al. (2013): Defining the core proteome of the chloroplast envelope membranes. In: *Frontiers in plant science* 4.
- Sklar, J. G.; Wu, T.; Kahne, D.; Silhavy, T. J. (2007): Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in Escherichia coli. In: *Genes & development* 21 (19), S. 2473–2484.
- Sommer, M. S.; Daum, B.; Gross, L. E.; Weis, B. L. M.; Mirus, O.; Abram, L. et al. (2011): Chloroplast Omp85 proteins change orientation during evolution. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (33), S. 13841–13846.
- Sommer, M. S.; Gould, S. B.; Lehmann, P.; Gruber, A.; Przyborski, J. M.; Maier, U.-G. (2007): Der1-mediated preprotein import into the periplastid compartment of chromalveolates? In: *Molecular biology and evolution* 24 (4), S. 918–928.
- Soo, R. M.; Hemp, J.; Parks, D. H.; Fischer, W. W.; Hugenholtz, P. (2017): On the origins of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration in Cyanobacteria. In: *Science (New York, N.Y.)* 355 (6332), S. 1436–1440.
- Spycher, C.; Herman, E. K.; Morf, L.; Qi, W.; Rehrauer, H.; Aquino Fournier, C. et al. (2013): An ER-directed transcriptional response to unfolded protein stress in the absence of conserved sensor-transducer proteins in Giardia lamblia. In: *Molecular microbiology* 88 (4), S. 754–771.
- Srivastava, R.; Deng, Y.; Shah, S.; Rao, A. G.; Howell, S. H. (2013): BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in Arabidopsis. In: *The Plant cell* 25 (4), S. 1416–1429.

- Stiller, J. W.; Schreiber, J.; Yue, J.; Guo, H.; Ding, Q.; Huang, J. (2014): The evolution of photosynthesis in chromist algae through serial endosymbioses. In: *Nature communications* 5, 5:5764.
- Stoebe, B.; Maier, U.-G. (2002): One, two, three: nature's tool box for building plastids. In: *Protoplasma* 219 (3-4), S. 123–130.
- Stone, S. J.; Vance, J. E. (2000): Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (44), S. 34534–34540.
- Stork, S.; Moog, D.; Przyborski, J. M.; Wilhelmi, I.; Zauner, S.; Maier, U. G. (2012): Distribution of the SELMA translocon in secondary plastids of red algal origin and predicted uncoupling of ubiquitin-dependent translocation from degradation. In: *Eukaryotic cell* 11 (12), S. 1472–1481.
- Stroud, D. A.; Becker, T.; Qiu, J.; Stojanovski, D.; Pfannschmidt, S.; Wirth, C. et al. (2011): Biogenesis of mitochondrial beta-barrel proteins: the POTRA domain is involved in precursor release from the SAM complex. In: *Molecular biology of the cell* 22 (16), S. 2823–2833.
- Struyvé, M.; Moons, M.; Tommassen, J. (1991): Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. In: *Journal of molecular biology* 218 (1), S. 141–148.
- Szabadkai, G.; Bianchi, K.; Várnai, P.; Stefani, D. de; Wieckowski, M. R.; Cavagna, D. et al. (2006): Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. In: *The Journal of cell biology* 175 (6), S. 901–911.
- Taniura, H.; Glass, C.; Gerace, L. (1995): A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. In: *The Journal of cell biology* 131 (1), S. 33–44.
- Teng, Y.-S.; Su, Y.-s.; Chen, L.-J.; Lee, Y. J.; Hwang, I.; Li, H.-M. (2006): Tic21 is an essential translocon component for protein translocation across the chloroplast inner envelope membrane. In: *The Plant cell* 18 (9), S. 2247–2257.
- Teske, B. F.; Wek, S. A.; Bunpo, P.; Cundiff, J. K.; McClintick, J. N.; Anthony, T. G.; Wek, R. C. (2011): The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. In: *Molecular biology of the cell* 22 (22), S. 4390–4405.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9), S. 4350–4354.
- Tranel, P. J.; Keegstra, K. (1996): A novel, bipartite transit peptide targets OEP75 to the outer membrane of the chloroplastic envelope. In: *The Plant cell* 8 (11), S. 2093–2104.
- Tsirigos, K. D.; Elofsson, A.; Bagos, P. G. (2016): PRED-TMBB2: improved topology prediction and detection of beta-barrel outer membrane proteins. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 32 (17), i665–i671.
- Tsirigos, K. D.; Peters, C.; Shu, N.; Käll, L.; Elofsson, A. (2015): The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. In: *Nucleic acids research* 43 (W1), W401–407.

- Tu, S.-L.; Chen, L.-J.; Smith, M. D.; Su, Y.-s.; Schnell, D. J.; Li, H.-M. (2004): Import pathways of chloroplast interior proteins and the outer-membrane protein OEP14 converge at Toc75. In: *The Plant cell* 16 (8), S. 2078–2088.
- Ulitzur, N.; Gruenbaum, Y. (1989): Nuclear envelope assembly around sperm chromatin in cell-free preparations from *Drosophila* embryos. In: *FEBS letters* 259 (1), S. 113–116.
- Ulitzur, N.; Harel, A.; Feinstein, N.; Gruenbaum, Y. (1992): Lamin activity is essential for nuclear envelope assembly in a *Drosophila* embryo cell-free extract. In: *The Journal of cell biology* 119 (1), S. 17–25.
- Ulitzur, N.; Harel, A.; Goldberg, M.; Feinstein, N.; Gruenbaum, Y. (1997): Nuclear membrane vesicle targeting to chromatin in a *Drosophila* embryo cell-free system. In: *Molecular biology of the cell* 8 (8), S. 1439–1448.
- Ulrich, T.; Gross, L. E.; Sommer, M. S.; Schleiff, E.; Rapaport, D. (2012): Chloroplast beta-barrel proteins are assembled into the mitochondrial outer membrane in a process that depends on the TOM and TOB complexes. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (33), S. 27467–27479.
- Ulrich, T.; Oberhettinger, P.; Schutz, M.; Holzer, K.; Ramms, A. S.; Linke, D. et al. (2014): Evolutionary conservation in biogenesis of beta-barrel proteins allows mitochondria to assemble a functional bacterial trimeric autotransporter protein. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (43), S. 29457–29470.
- Urano, F.; Wang, X.; Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Chung, P.; Harding, H. P.; Ron, D. (2000): Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. In: *Science (New York, N.Y.)* 287 (5453), S. 664–666.
- van Anken, E.; Pincus, D.; Coyle, S.; Aragón, T.; Osman, C.; Lari, F. et al. (2014): Specificity in endoplasmic reticulum-stress signaling in yeast entails a step-wise engagement of HAC1 mRNA to clusters of the stress sensor Ire1. In: *eLife* 3, e05031.
- van der Zand, A.; Braakman, I.; Tabak, H. F. (2010): Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum. In: *Molecular biology of the cell* 21 (12), S. 2057–2065.
- van Dooren, G. G.; Tomova, C.; Agrawal, S.; Humbel, B. M.; Striepen, B. (2008): *Toxoplasma gondii* Tic20 is essential for apicoplast protein import. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (36), S. 13574–13579.
- van Vliet, A. R.; Giordano, F.; Gerlo, S.; Segura, I.; van Eygen, S.; Molenberghs, G. et al. (2017): The ER Stress Sensor PERK Coordinates ER-Plasma Membrane Contact Site Formation through Interaction with Filamin-A and F-Actin Remodeling. In: *Molecular cell* 65 (5), 885–899.
- Verfaillie, T.; Rubio, N.; Garg, A. D.; Bultynck, G.; Rizzuto, R.; Decuypere, J.-P. et al. (2012): PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. In: *Cell death and differentiation* 19 (11), S. 1880–1891.
- Villarejo, A.; Buren, S.; Larsson, S.; Dejardin, A.; Monne, M.; Rudhe, C. et al. (2005): Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. In: *Nature cell biology* 7 (12), S. 1224–1231.

- Volokhina, E. B.; Grijpstra, J.; Stork, M.; Schilders, I.; Tommassen, J.; Bos, M. P. (2011): Role of the periplasmic chaperones Skp, SurA, and DegQ in outer membrane protein biogenesis in *Neisseria meningitidis*. In: *Journal of bacteriology* 193 (7), S. 1612–1621.
- Wakasa, Y.; Hayashi, S.; Ozawa, K.; Takaiwa, F. (2012): Multiple roles of the ER stress sensor IRE1 demonstrated by gene targeting in rice. In: *Scientific reports* 2, 944.
- Wang, Y.; Wang, R.; Jin, F.; Liu, Y.; Yu, J.; Fu, X.; Chang, Z. (2016): A Supercomplex Spanning the Inner and Outer Membranes Mediates the Biogenesis of beta-Barrel Outer Membrane Proteins in Bacteria. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (32), S. 16720–16729.
- Wenz, L.-S.; Ellenrieder, L.; Qiu, J.; Bohnert, M.; Zufall, N.; van der Laan, M. et al. (2015): Sam37 is crucial for formation of the mitochondrial TOM-SAM supercomplex, thereby promoting beta-barrel biogenesis. In: *The Journal of cell biology* 210 (7), S. 1047–1054.
- Woehle, C.; Dagan, T.; Martin, W. F.; Gould, S. B. (2011): Red and problematic green phylogenetic signals among thousands of nuclear genes from the photosynthetic and apicomplexa-related *Chromera velia*. In: *Genome biology and evolution* 3, S. 1220–1230.
- Xie, W.; Chojnowski, A.; Boudier, T.; Lim, J. S. Y.; Ahmed, S.; Ser, Z. et al. (2016): A-type Lamins Form Distinct Filamentous Networks with Differential Nuclear Pore Complex Associations. In: *Current biology : CB* 26 (19), S. 2651–2658.
- Ye, C.-M.; Chen, S.; Payton, M.; Dickman, M. B.; Verchot, J. (2013): TGBp3 triggers the unfolded protein response and SKP1-dependent programmed cell death. In: *Molecular plant pathology* 14 (3), S. 241–255.
- Ye, J.; Rawson, R. B.; Komuro, R.; Chen, X.; Davé, U. P.; Prywes, R. et al. (2000): ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. In: *Molecular cell* 6 (6), S. 1355–1364.
- Yoon, H. S.; Hackett, J. D.; Ciniglia, C.; Pinto, G.; Bhattacharya, D. (2004): A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. In: *Molecular biology and evolution* 21 (5), S. 809–818.
- Yorimitsu, T.; Sato, K. (2012): Insights into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. In: *Molecular biology of the cell* 23 (15), S. 2930–2942.
- Yoshida, H.; Haze, K.; Yanagi, H.; Yura, T.; Mori, K. (1998): Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (50), S. 33741–33749.
- Yoshida, H.; Okada, T.; Haze, K.; Yanagi, H.; Yura, T.; Negishi, M.; Mori, K. (2000): ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. In: *Molecular and cellular biology* 20 (18), S. 6755–6767.
- Yu, N. Y.; Wagner, J. R.; Laird, M. R.; Melli, G.; Rey, S.; Lo, R. et al. (2010): PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (13), S. 1608–1615.

Zaslavskaja, L. A.; Lippmeier, J. C.; Kroth, P. G.; Grossman, A. R.; Apt, K. E. (2000): Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. In: *Journal of phycology* 36 (2), S. 379–386.

Zhang, L.; Chen, H.; Brandizzi, F.; Verchot, J.; Wang, A. (2015): The UPR branch IRE1-bZIP60 in plants plays an essential role in viral infection and is complementary to the only UPR pathway in yeast. In: *PLoS genetics* 11 (4), e1005164.

Zimorski, V.; Ku, C.; Martin, W. F.; Gould, S. B. (2014): Endosymbiotic theory for organelle origins. In: *Current opinion in microbiology* 22, S. 38–48.

Zufferey, M.; Montandon, C.; Douet, V.; Demarsy, E.; Agne, B.; Baginsky, S.; Kessler, F. (2017): The Novel Chloroplast Outer Membrane Kinase KOC1 Is a Required Component of the Plastid Protein Import Machinery. In: *The Journal of biological chemistry* 292 (17), S. 6952–6964.

7. Anhang

7.1 Analyse von wahrscheinlich plastidären Proteinen

Tabelle 4: Analyse von als mit hoher Wahrscheinlichkeit plastidär vorhergesagten Proteinen auf β -barrel Strukturen, α -Helices und Funktion. Die Proteine wurden aus einer Analyse auf N-terminale Zielsteuerungssequenzen entnommen (Gruber et al. 2015). Alle Proteine, die von mindestens 2 Algorithmen als β -barrel Protein vorhergesagt wurden, wurden einer eingehenden Analyse unterzogen. Unter den verwendeten Vorhersagealgorithmen wurden fünf verwendet, die α -Helices vorhersagen und vier die β -barrel Proteine vorhersagen (Bagos et al. 2004a; Bagos et al. 2004b; Bernsel et al. 2008; Berven et al. 2004; Käll et al. 2004, 2007; Ou et al. 2008; Reynolds et al. 2008). Die Zahlen geben die Anzahl der vorhergesagten α -Helices an. "TM" = Transmembrandomänen (β -Strang). Proteine ohne putative Funktion wurden nicht weiter berücksichtigt. Die vorhergesagten Funktionen sprachen gegen eine Lokalisation in der dritten Plastidenmembran.

Protein ID	TMHMM (α -Helix)	Topcons (α -Helix)	Scampi (α -Helix)	Philius (α -Helix)	Phobius (α -Helix)	PredTMBB (β -barrel)	MCMBB (β -barrel)	BOMP (β -barrel)	TMBETAdisc (β -barrel)	Funktion (BLAST)
Phatr2a_19661	0	0	0	0	0	+ (2 TM)	+ 0,012	-	+	<i>Phage shock protein/ 30kDa membrane-associated protein</i>
Phatr2a_20087	0	0	0	0	0	+ (10 TM)	+ 0,011	-	+	<i>heme oxygenase</i>
Phatr2a_20577	1	2	2	0	0	-	+ 0,009	-	+	<i>Peroxiredoxin (PRX) family, Bacterioferritin comigratory protein (BCP) subfamily</i>
Phatr2a_21594	0	0	0	0	0	+ (13 TM)	+ 0,007	-	+	<i>PS II assembly factor, hcf136</i>
Phatr2a_22054	0	0	0	0	0	+ (5 TM)	+ 0,019	-	+	<i>FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, immunophilin</i>
Phatr2a_26293	0	0	0	0	0	+ (2 TM)	+ 0,008	-	-	PsbU
Phatr2a_34564	0	0	0	0	0	+ (2 TM)	+ 0,007	-	+	-

7. Anhang

Phatr2a_39366	1	2	2	0	0	-	+ 0,013	-	+	-
Phatr2a_40048	0	0	0	0	0	-	+ 0,002	-	+	<i>Ribosome recycling factor</i>
Phatr2a_41038	0	0	0	0	0	+ (2 TM)	+ 0,009	-	-	-
Phatr2a_42612	0	0	0	0	0	+ (2 TM)	+ 0,004	-	-	-
Phatr2a_43037	0	2	5	0	0	+ (2 TM)	+ 0,010	-	+	-
Phatr2a_43698	0	2	2	0	0	+ (2 TM)	+ 0,004	-	+	PsbP
Phatr2a_44518	0	0	0	0	0	+ (2 TM)	+ 0,007	-	+	<i>atypical (a) SDRs, subgroup 5, NADP-binding protein, oxidoreductase, fatty acid metabolism</i>
Phatr2a_44659	0	2	2	0	0	+ (2 TM)	+ 0,009	-	-	-
Phatr2a_44748	0	0	0	0	0	+ (2 TM)	+ 0,005	-	-	<i>proton gradient regulation 5</i>
Phatr2a_45465	0	0	0	0	0	+ (2 TM)	+ 0,009	-	+	-
Phatr2a_45515	0	0	2	0	0	+ (2 TM)	+ 0,005	-	+	<i>NAD(P) binding domain, Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases</i>
Phatr2a_45715	0	0	0	0	0	-	+ 0,004	-	+	<i>SAP domain (putative DNA/RNA binding motif)</i>

7. Anhang

Phatr2a_45813	0	0	0	0	0	+ (2 TM)	+ 0,009	-	+	<i>Plastid lipid-associated protein/fibrillin conserved domain protein</i>
Phatr2a_46370	0	1	2	0	0	+ (2 TM)	+ 0,046	-	-	-
Phatr2a_46670	0	1	2	0	0	+ (4 TM)	+ 0,012	-	+	<i>C-terminal processing peptidase, S41 family</i>
Phatr2a_46711	0	0	0	0	0	+ (4 TM)	+ 0,015	-	-	-
Phatr2a_46742	0	0	0	0	0	+ (2 TM)	+ 0,001	-	+	<i>Mitochondrial carrier</i>
Phatr2a_46825	0	0	0	0	1	+ (2 TM)	+ 0,041	-	+	-
Phatr2a_46943	0	0	0	0	0	+ (1 TM)	+ 0,039	-	-	-
Phatr2a_47643	0	0	0	0	0	+ (2 TM)	-	-	+	<i>phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase family protein</i>
Phatr2a_47649	0	0	0	0	0	-	+ 0,008	-	+	-
Phatr2a_47803	0	0	2	0	0	+ (2 TM)	+ 0,014	-	+	-
Phatr2a_48237	0	0	0	0	0	+ (2 TM)	+ 0,055	-	-	-
Phatr2a_48286	0	0	0	0	0	+ (10 TM)	+ 0,007	+	+	<i>ascorbate-peroxidase</i>
Phatr2a_48723	4	5	5	3	3	+ (2 TM)	+ 0,008	-	+	<i>Zinc metalloprotease, regulated intramembrane protease (M50)</i>

7. Anhang

Phatr2a_49584	2	2	2	2	1	-	+ 0,009	-	+	Peptidase S49
Phatr2a_49618	3	3	2	2	0	+ (2 TM)	+ 0,006	-	+	-
Phatr2a_49703	0	0	0	0	0	+ (10 TM)	+ 0,002	-	-	-
Phatr2a_49877	5	3	4	4	4	+ (4 TM)	+ 0,016	-	-	-
Phatr2a_50071	11	13	11	13	13	+ (2 TM)	+ 0,010	-	-	<i>Solute carrier families 5 and 6-like</i>
Phatr2a_54499	0	0	0	0	0	+ (4 TM)	+ 0,011	-	+	<i>extrinsic protein of Photosystem II</i>
Phatr2a_55057	3	3	3	1	1	+ (1 TM)	+ 0,012	-	-	PsbM
Phatr2a_56299	0	0	0	0	0	+ (8 TM)	+ 0,020	-	-	<i>fucoxanthin/chlorophyll binding protein</i>
Phatr2a_56340	0	4	5	3	0	+ (2 TM)	+ 0,002	-	-	<i>fucoxanthin/chlorophyll binding protein</i>
Phatr2a_56388	1	2	2	0	0	-	+ 0,013	-	+	-
Phatr2u_1569	0	0	0	0	0	-	+ 0,004	-	+	<i>SAP domain (putative DNA/RNA binding motif)</i>
Phatr2u_1699	0	0	0	0	0	+ (2 TM)	+ 0,008	-	+	<i>SOUL heme-binding protein</i>

7.2 Vorhersage N-terminaler Zielsteuerungssequenzen

Tabelle 5: Vorhersage N-terminaler Zielsteuerungssequenzen der von PSORTb vorhergesagten *Outer Membrane* Proteine. a= Vorhersage eines Signalpeptids war unklar. Das Protein wurde aufgrund der Homologie zu einer Peptidase M11/ Gametolysin als falsch positiv aus der Liste entfernt. b= Vorhersage des Signalpeptids war unklar und wurde nicht berücksichtigt. c= Vorhersage durch BLAST als putativer mitochondrialer Transkriptionsfaktor. Das Protein wurde aufgrund dieser Vorhersage aus der Liste als falsch positiv entfernt. "+/-": Vorhersage durch SignalP 3.0 und 4.1 unterschiedlich, "SA": Vorhersage eines Signalankers, "M": Vorhersage einer mitochondrialen Zielsteuerungssequenz, "S": Vorhersage eines Signalpeptids (Bendtsen et al. 2004; Emanuelsson et al. 2000; Petersen et al. 2011).

Protein ID	SignalP 3.0/4.1	TargetP (non-plant network)
18967	-	-
19664	-	-
20517	-	M
20857	-	-
22020	-	M
22399	-	-
24236	-	-
15878	-	-
31692	-	-
31737	-	-
31749	-	-
32062	-	-
32549	-	M
32666	-	-
32828	-	M
33015	-	-
33063	-	-
33107 ^a	+/- (weak prediction)	S
33134 ^b	+/- (weak prediction)	S
33143	-	-
33158	-	-
33216	-	-
33247	-	-
33274 ^c	+	S
33341	-	-
33554	-	-
33600	-	-
33713	-	-
33851	-	-
33888	-	-
34083	-	-
34126	-	M
34136	-	M
34161	-	-
34173	-	-
34265	-	-
34361	-	-
44848	-	-
44859	-	M
44901	-	-

44949	-	M
44998	-	-
45084	-	-
45126	-	-
34766	-	-
45170	-	-
45225	-	-
35200	-	M
45524	-	M
45577	-	-
35741	-	-
35842	-	-
36221	+/- (SA)	M
46293	+/- (SA)	M
46323	-	-
36284	-	M
46402	-	-
36444	-	M
46708	-	M
46726	-	-
36800	-	M
36916	-	-
36986	-	-
37059	-	-
37063	-	-
37706	-	-
37878	-	-
37881	-	-
37887	-	-
37981	-	M
37990	-	M
38138	-	-
38250	-	M
38330	-	M
38350	-	-
38592	-	-
38833	-	-
39130	-	-
39239	-	-
39264	-	M
39310	-	-
39477	-	-
39633	-	-
39734	-	-
39767	-	-
39963	-	S
39994	-	-
40115	-	-
40134	-	-

40379	-	-
40386	-	-
40490	-	M
49808	-	-
40789	-	-
40792	-	-
40825	-	-
40929	-	-
40964	-	-
41499	-	-
41595	-	-
41651	-	-
42655	-	-
43322	+/- (SA)	M
43996	-	-
44469	-	-
44648	-	-
44836	-	-
46924	-	-
52331	-	-
52669	-	M
53472	-	-
29206	-	-

7.3 Vorhersage durch TMBETA-net und BOCTOPUS1

Tabelle 6: Vorhersagen durch TMBETA-net und BOCTOPUS1: Nur ein Teil der getesteten putativen β -barrel Proteine konnte mit TMBETA-net und BOCTOPUS1 analysiert werden (Gromiha et al. 2005; Hayat und Elofsson 2012). Positive Vorhersagen wurden mit einem "+" gekennzeichnet, negative mit einem "-". Hinter jeder Vorhersage ist die Anzahl der putativen β -Transmembrandomänen angegeben (TM).

ProteinID	TMBETA-net	BOCTOPUS1
23673	+ (12 TM)	+ (4 TM)
30562	+ (25 TM)	+ (10 TM)
37910	+ (10 TM)	+ (12 TM)
43805	+ (20 TM)	-
44924	+ (26 TM)	+ (16 TM)
45678	+ (11 TM)	+ (16 TM)
45803	+ (20 TM)	+ (18 TM)
48025	+ (13 TM)	+ (8 TM)
48890	+ (0 TM)	+ (18 TM)
49618	+ (21 TM)	+ (2 TM)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Uwe Maier für die interessante Themenstellung im Zusammenhang mit der Evolution komplexer Plastiden, die Bereitstellung der finanziellen Mittel und des Arbeitsplatzes sowie für die Möglichkeit an verschiedenen Konferenzen teilzunehmen.

Ich möchte allen Mitgliedern meiner Prüfungskommission danken, insbesondere Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch für die Erstellung des Zweitgutachtens sowie Prof. Dr. Ralf Jakob und Prof. Dr. Susanne Önel als weitere Mitglieder der Kommission.

Ich bedanke mich bei Dr. Stefan Zauner, Stephanie Morris, Stefanie Gasch und meiner Schwester Alina für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Dr. Stefan Zauner möchte ich ein weiteres Mal danken für viele hilfreiche Ratschläge und Diskussionen im Laboralltag.

Dr. Daniel Moog danke ich für die Hilfe beim Umgang mit den Genomdatenbanken von *E. huxleyi* und *B. natans* und seine Unterstützung bei der Analyse. Ich danke außerdem Dr. Simone Stork und Dr. Julia Lau für die Einweisung in die Genmodellanalyse und die Proteinanalytik. Dr. Franziska Hempel und Dr. Simone Stork danke ich außerdem für die Bereitstellung verschiedener Konstrukte.

An dieser Stelle sei auch Angelika Diehl genannt, die mit ihrer Bachelorarbeit einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat.

Ich danke allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Maier für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und schöne Unternehmungen auch abseits der Wissenschaft.

Ich möchte mich auch bei meinen Eltern Hugo und Heike bedanken, die mir während der gesamten Zeit meines Studiums und der Promotion sowie darüber hinaus immer ihre volle Unterstützung gewährt haben.

Stefanie Schramm, Wayne und Boba haben mir auch in schweren Zeiten immer einen positiven Ausblick ermöglicht.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Jonny Gentil

geboren am 22.05.1989 in Aschaffenburg

Promotion

seit 11/2013

Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie

Promotion im Fachgebiet Zellbiologie

Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Uwe Maier

Titel der Dissertation: „Identifikation neuer Komponenten der dritten Plastidenmembran und Subkompartimentierung des endoplasmatischen Retikulums in *Phaeodactylum tricornutum*“

Hochschulausbildung

10/2011-09/2013

Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie

Masterstudium mit den Schwerpunkten Zellbiologie,

Photobiologie, sowie molekulare und zelluläre Infektionsbiologie

Masterarbeit im Fachgebiet Zellbiologie

Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Uwe Maier

Titel der Masterarbeit: „Gene silencing durch eine artifizielle microRNA und Studien der Unfolded Protein Response (UPR) in *Phaeodactylum tricornutum*“

10/2008 - 06/2011

Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie

Bachelorstudium, Bachelorarbeit im Fachgebiet Zellbiologie

Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Uwe Maier

Titel der Bachelorarbeit: „Übertragung einer Gen-Knock-Out-Technik auf den Modellorganismus *Phaeodactylum tricornutum*“

Schulische Ausbildung

1999 - 2008

Hanns-Seidel-Gymnasium, Hösbach

Allgemeine Hochschulreife

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation

„Identifikation neuer Komponenten der dritten Plastidenmembran

und

Subkompartimentierung des endoplasmatischen Retikulums in

Phaeodactylum tricornutum“

Selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als den von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 13.12.2017